

**PRIMÄRE UND SEKUNDÄRE
IMMUNANTWORT DER MAUS NACH
IMMUNISIERUNG MIT NATIVEN UND
PROTEINGEKOPPELTEN KANINCHEN-
ERYTHROZYTEN**

Katharina Pachmann

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0090

Aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut der Universität München

Direktor: Professor H. Eyer

PRIMÄRE UND SEKUNDÄRE IMMUNANTWORT DER MAUS
NACH IMMUNISIERUNG MIT NATIVEN UND PROTEINGEKOPPELTEN
KANINCHENERYTHROZYTEN

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Katharina Pachmann
aus
Neuendettelsau

Jahr
1973

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Schierz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Braun-Falco
Dekan:	Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 1. 1974



Meinen Eltern

Inhalt

A. Einleitung

B. Materialien und Methoden

I. Lösungen

II. Tiere

III. Antigene

IV. Immunisierung der Tiere

V. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

1. Blut

2. Milzzellen

VI. Immunologische Analysen

1. Serumantikörper

a) Nachweis der Hämolysine

b) Nachweis der Agglutinine

2. Milzzellen

a) Agar-Plaque-Test

b) Modifizierter Plaque-Test

c) Serologischer Nachweis von Antikörpern in Lymphozyten mit Hilfe von Immunfluoreszenz

VII. Zellmorphologische Untersuchungen

1. Giemsa-Färbung

2. Methylgrün-Pyronin-Färbung

C. Ergebnisse

I. Kopplung von Rinderserumalbumin (RSA) an Erythrozyten- membranen

II. Absetzungsschema

III. Serologischer Antikörpernachweis

1. Erythrozytenspezifische Antikörper mit lytischer Aktivität

a) Primärantwort nach einmaliger Injektion von Kaninchenblutkörperchen

- b) Primärantwort nach einmaliger Injektion von Kaninchenblutkörperchen mit gekoppeltem Rinderserumalbumin (+ RSA)
 - c) Sekundärantwort nach Zweitinjektion von Kaninchenblutkörperchen (+ RSA)
2. Erythrozytenspezifische Antikörper mit agglutinierender Aktivität
- a) Primärantwort nach einmaliger Injektion von Kaninchenblutkörperchen
 - b) Primärantwort nach einmaliger Injektion von Kaninchenblutkörperchen + RSA
 - c) Sekundärantwort nach Zweitinjektion von Kaninchenblutkörperchen + RSA
3. Passive Hämagglutination (RSA-spezifische Antikörper)

IV. Zellulärer Antikörpernachweis

1. Nachweis antikörperbildender Zellen mittels des Agar-Plaques-Tests
- a) Primärantwort nach einmaliger Injektion von Kaninchenblutkörperchen
 - b) Primärantwort nach einmaliger Injektion von Kaninchenblutkörperchen + RSA
 - c) Sekundärantwort nach Zweitinjektion von Kaninchenblutkörperchen + RSA
2. Nachweis RSA-spezifischer Antikörper mit Hilfe des modifizierten Plaques-Tests
3. Fluoreszenzserologische Studien an einzelnen Zellen
- a) Primärantwort nach einmaliger Injektion von Kaninchenblutkörperchen
 - b) Primärantwort nach einmaliger Injektion von Kaninchenblutkörperchen + RSA
 - c) Sekundärantwort nach Zweitimmunisierung mit Kaninchenblutkörperchen + RSA

V. Zellmorphologie und RNS-Bestimmung

1. Giemsaefärbung und Differenzierung der Lymphozyten
2. Methylgrün- Pyronin- Färbung zur Charakterisierung der Zellen hinsichtlich ihres RNS - Gehaltes
 - a) Primärantwort
 - b) Sekundärantwort

VI. Vergleiche

1. Zusammenfassung der Serologischen Methoden
 - a) Lytische Antikörper
 - b) Agglutinierende Antikörper
 - c) Vergleich
 - d) Passive Hämagglutination
2. Zusammenfassung der Ergebnisse zum Nachweis von Immunreaktionen auf zellulärer Ebene.
 - a) Direkter und modifizierter Plaque-Test
 - b) Fluoreszenzserologie
 - c) Vergleich der beiden Methoden
3. Vergleich der zellulären und serologischen Methoden
4. Zellmorphologische Ergebnisse

D. Diskussion

- I. Methoden
- II. Immunantwort gegen ein Antigen
- III. Immunantwort gegen zwei Antigene
- IV. Gegenseitige Beeinflussung der beiden Antigene
- V. RNS - Synthese
- VI. Anzahl der an der Immunantwort beteiligten Zellen

Schlußbemerkungen

Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

A. EINLEITUNG

Die Bildung von Antikörpern ist eine Fähigkeit des Säugetierorganismus, auf bestimmte stoffliche Reize antigener Natur zu reagieren. Diese Fähigkeit ist an die Anwesenheit der weißen Blutzellen gebunden, speziell an bestimmte Zellen der lymphatischen Reihe, die als Produzenten der Antikörperbildung bekannt sind. Es erscheint sicher, daß diese antikörperbildenden Zellen Nachkommen der immunkompetenten Zellen sind, die in der Lage sind, spezifisch das Antigen zu erkennen, vielleicht über präformierte membrangebundene Rezeptoren (Wigzell 1970).

1. Je nach Antigenizität und Dosis des zugeführten Antigens kommt es nach einer bestimmten Zeit zu einem Anstieg des Antikörpertiters im Serum, so zum Beispiel nach Gabe von Schaferythrozyten zu einem Anstieg der Serumantikörper am 3. Tag mit etwa gleichzeitigem Anstieg der Zahl der plaquebildenden Zellen gegen die Schaferythrozyten. Bis zum 8. Tag nimmt dann die Zahl der plaquebildenden Zellen wieder ab, die Serumtiter bleiben noch länger erhöht.
2. Zur Erfassung einer Antigen-bedingten Immunantwort auf der Basis der Antikörpersynthese steht eine Reihe von immunologischen Verfahren zur Verfügung, welche teils zum Nachweis freier Antikörper im Blut, teils zur Erfassung zellständiger Antikörper geeignet sind.
3. Der Vergleich verschiedener Methoden zur Erfassung der Immunantwort auf unterschiedlichen Ebenen ermöglicht die Beurteilung der Methoden hinsichtlich ihres Wertes für die Erfassung der Antwort, vermag aber auch Hinweise auf bestimmte Detailvorgänge innerhalb der Antwort zu geben.
In der vorliegenden Arbeit wurde vor allem versucht, zu bestimmen, wie der Organismus auf die synchrone Gabe zweier aneinander gekoppelter Antigene reagiert.

4. Obwohl es eine Reihe von Arbeiten gibt, die über das Verhalten des Immunsystems bei gleichzeitiger Zufuhr verschiedener Antigene berichten, fehlt es noch an Untersuchungen über die Immunantwort bei gleichzeitiger Zufuhr von miteinander gekoppelten Antigenen.

Zu diesem Zwecke wurden Mäuse mit einem zellulären Antigen, Kaninchenblutkörperchen, immunisiert, und die darauffolgende Immunantwort verglichen mit der Immunantwort, die auf die Gabe von Kaninchenblutkörperchen mit einem darangekoppelten zweiten Antigen, Rinderserumalbumin (RSA), erfolgte.

B. MATERIALIEN UND METHODEN

I. Verwendete Lösungen

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung):

1000 ml. aqua dest. +
8 g Na Cl
0,2 g K Cl
2,89 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$
0,2 g KH_2PO_4
0,1 g Ca Cl_2
0,1 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$

Earles Salzlösung:

1000 ml aqua dest. +
6,8 g NaCl
0,4 g KCl
0,2 g $\text{Mg SO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
0,158g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
0,2 g CaCl_2
1,0 g Glucose
+ Na H CO_3 2,2 g/l. pH einstellen!

Abkürzungen

PBS : phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PVP : Polyvinylpyrrolidon
EDTA: Äthylendiamidtetraessigsäure
ECDI: Carbodiimid: 1-Äthyl-3- (3-dimethylaminopropyl)
Carbodiimid Hydrochlorid

II. Tiere

Zur Immunisierung wurden vier bis fünf Wochen alte Mäuse des Stammes NMRI verwendet. Sie wurden mit handelsüblichem Trockenfutter ernährt und bekamen Wasser ad libitum.

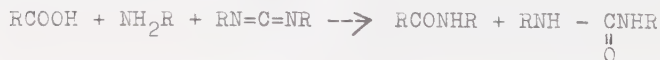
III. Antigene

Zur Immunisierung diente eine 5 % Suspension von plasmafrei-gewaschenen Kaninchenerythrozyten, beziehungsweise eine 5 % Suspension von Kaninchenerythrozyten, beladen mit RSA. Durch die Kopplung von RSA wird den natürlichen Antigenen und Haptenen der Erythrozytenmembran ein weiteres, nunmehr zellulär fixiertes Antigen hinzugefügt, dessen Antigenizität getrennt meßbar ist.

Carbodiimid als Kopplungsreagenz

Die Kopplung führten wir nach der von Johnson (1966) beschriebenen Methode durch. 0,5 ml einer 50% igen Erythrozytensuspension in PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung 0,9 % pH 7,2) wurden zu 30 mg RSA (Rinderserumalbumin) in 3 ml PBS zugegeben und nach Zufügen von 100 mg ECDI (1- Äthyl-3- (3- dimethylaminopropyl) Carbodiimid Hydrochlorid) in 0,5 ml PBS 60 Minuten inkubiert. Die Reaktion entspricht der von Sheehan angegebenen Methode (1955) zur Bildung von Peptidbindungen, angewendet auf ein System mit einem Protein und einer Zellmembran und deren freie Amino- und Carboxylgruppen.

Die Reaktion läuft nach folgendem Schema ab:



(Khorana 1953)

Die sensibilisierten Erythrozyten wurden dann zweimal in 2 % EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure) ausgewaschen, und mit dem Sediment in der 2 % EDTA-Lösung eine 2% ige Suspension hergestellt.

Die Kopplung wurde sowohl mit Kaninchenerythrozyten als auch mit Schaferythrozyten durchgeführt.

Als weitere Kopplungsmethoden boten sich die Bindung von Protein an tanninbehandelte Erythrozyten nach der Methode von Boyden (1951) und die Bindung mit Hilfe von tetrazötiertem Benzidin (Pressman 1942) an formalinbehandelte Erythrozyten an.

Wir gaben der Carbodiimid-Methode den Vorzug, denn die Kopplung mit Carbodiimid ist einfach, rasch durchführbar und geschieht unter sehr milden Bedingungen (Goodfriend 1964). Die Erythrozyten können ein bis zwei Stunden aufbewahrt werden, ohne daß eine merkliche Lyse eintritt, wie das bei den benzidinbehandelten Erythrozyten der Fall ist.

Die optimale Inkubationszeit beträgt 60 Minuten. Ein Überschreiten dieser Zeit um einige Minuten führt zu keiner signifikanten Veränderung des Kopplungseffektes (Johnson 1966), während bei den anderen Methoden die genaue Einhaltung der Zeitspannen zu fordern ist.

Nach der Sensibilisierung tanninisierter Erythrozyten mit Protein werden nach Feinberg (1957) die angelagerten Proteine langsam wieder von der Membran eluiert, da sie nur mit schwachen Assoziationskräften gebunden werden. Carbodiimid führt dagegen zur kovalenten Bindung des Proteins.

IV. Immunisierung der Tiere

Am Tage 0 wurden zweimal acht Mäuse mit je einem Milliliter einer 5% igen Suspension von gekoppelten Kaninchenerythrozyten intraperitoneal injiziert und weitere acht Mäuse mit einer 5% igen Suspension von ungekoppelten Kaninchenerythrozyten. 14 Tage später erhielten acht der mit gekoppelten Erythrozyten immunisierten Tiere eine Boosterinjektion von nochmals 1 ml einer 5% igen Suspension von gekoppelten Kaninchenerythrozyten intraperitoneal. Die Mäuse wurden im Abstand von 2 - 3 Tagen abgesetzt, beginnend am 5. Tage nach primärer Immunisierung.

V. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

1. Blut

Die Tiere wurden mit Chloroform betäubt und Blut zur serologischen Untersuchung durch Herzpunktion unter Sichtkontrolle entnommen. Es konnten je Tier etwa 4 ml Blut gewonnen werden.

Die Blutproben wurden zunächst 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt, bis sich der Blutkuchen abgesetzt hatte. Nach Zentrifugieren bei 3000 Upm wurde der Überstand sorgfältig abpipettiert. Nach nochmaligem Zentrifugieren und Abpipettieren wurden die Seren bis zur Verarbeitung bei 4°C aufbewahrt.

2. Milzzellen

Die Milzen zur Untersuchung der an Milzzellen ablaufenden Immunantwort wurden nach steriler Eröffnung der Bauchhöhle im Ganzen entfernt und sofort in eisgekühlte Nährlösung gegeben. Die weitere Präparation erfolgte ebenfalls unter sterilen Bedingungen.

Die Nährlösung, in die die Milzzellen aufgenommen wurden, bestand aus Earle's Grundmedium ohne Zusätze von Aminosäuren oder Antibiotika. Da die Zellen darin nicht länger als

2 Stunden kultiviert wurden, erübrigten sich weitere Zusätze.

Die Milzen wurden vorsichtig mit Pinzetten in das Medium ausgedrückt und die Suspension nochmals langsam durch eine Injektionsnadel aufgezogen, um Zellklumpen zu suspendieren. Nach dieser Behandlung konnten unter dem Mikroskop sehr gute Verteilungen der Zellen festgestellt werden.

Die Gesamtzahl der Lymphozyten wurde mit Hilfe der Gentiana-Essigsäure-Färbung in einer Bürkerkammer ausgezählt, und die Suspension auf rund 10^6 Zellen pro ml eingestellt.

Der Prozentsatz der lebenden Zellen wurde mit der Trypanblauexclusionsmethode bestimmt.

VI. Immunologische Analysen

1. Serumantikörper

a) Nachweis der Hämolsine

Zum Nachweis erythrozytenspezifischer lysierender Antikörper wurden von den Mäuseseren mit Veronalpuffer eine Verdünnungsreihe von 1 : 10 bis 1 : 24000 hergestellt. Die Menge betrug 0,25 ml pro Röhrchen. Zu jeder Verdünnungsstufe wurden 0,25 ml einer 1% igen Kaninchenblutkörperchen-Suspension zupipettiert als Komplementzusatz je 0,25 ml eines 1 : 10 verdünnten Meerschweichenserums. Die erste Ablesung erfolgte nach einer 20-minütigen Inkubation in einem Wasserbad von 37° C und eine zweite Ablesung nach weiteren 40 Minuten. Als Endpunkt der Titration wurde diejenige Verdünnung gewertet, die noch eine 50 % Hämolyse aufwies. Als Kontrollen dienen das Serum einer nichtimmunisierten Maus, ferner Ansätze mit Hammelblutkörperchen (0,25 ml; 1%) bzw. Serum mit Kaninchenblutkörperchen ohne Komplement. Die verwendeten Seren wurden vor dem Beginn der Versuchsreihe bei 56° C 30 Minuten inaktiviert. Der Hämolsinnachweis erfolgte sowohl

bei den mit Kaninchenblutkörperchen alleine als auch bei den mit Kaninchenblutkörperchen + RSA immunisierten Tieren.

b) Nachweis erythrozytenspezifischer agglutinierender Antikörper

i) Der Nachweis erythrozytenspezifischer agglutinierender Antikörper erfolgte im direkten Hämagglutinationstest. Dazu wurden die mit je 0,2 ml beschickten Röhrchen einer mit inaktiviertem Serum und PBS hergestellten Verdünnungsreihe von 1 : 10 bis 1 : 163000 mit 0,2 ml einer 0,5%igen Suspension nativer Kaninchenblutkörperchen versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Als Kontrolle dienten Ansätze mit Serum nicht immunisierter Tiere. Die Ansätze wurden über Nacht stehen gelassen und die Titerröhrchen wurden nach vorsichtigem Aufschütteln der Erythrozyten bestimmt.

ii) Indirekter Test:

In Röhrchen ohne Agglutination wurden die Erythrozyten serumfrei gewaschen, in 0,4 ml PBS aufgenommen, nochmals über Nacht mit Coombsserum (Kaninchen - anti - Maus - Serum) bei Raumtemperatur inkubiert und abgelesen.

iii) Passive Hämagglutination:

Der Nachweis RSA-spezifischer Agglutinine erfolgte im passiven Hämagglutinationstest nach Borduas (1953). Abweichend davon wurde die zur Verdünnung der Seren sowie zur Suspension der Blutkörperchen benutzte PBS-Lösung nicht mit 0,35 % PVP sondern mit 2 % EDTA versetzt. Die mit je 0,2 ml beschickten Röhrchen der Serumverdünnungsreihe von 1 : 10 bis 1 : 24000 wurden in diesem Fall mit 0,2 ml einer 0,4 %igen Suspension von RSA-sensibilisierten Schaferythrozyten versetzt. Die Sensibilisierung der Erythrozyten erfolgte über Carbodiimid.

Nach Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 2 Stunden wurde die Ablesung nach Aufbewahrung der Röhrchen über Nacht im Kühlschrank vorgenommen. Dazu wurde die Sedimentkuppe ohne vorheriges Aufschütteln der Röhrchen von unten mit einer Lupe gegen von oben einfallendes Licht betrachtet. Häutchenbildung sowie knopf- oder ringförmige Sedimente mit unregelmäßigen Rändern galten als positiv.

2. Untersuchungen an Milzzellen

Die Milzzellen wurden zum quantitativen Nachweis von Zellen mit Antikörperbildung gegen Kaninchenblutkörperchen bzw. RSA im Plaque-Test sowie Immunfluoreszenztest untersucht.

- a) Agar-Plaque-Test: Der Agar-Plaque-Test erfolgte nach der Methode von Jerne und Nordin (1963 a,b) modifiziert nach Friedmann (1965). 0,7 g Agarose wurden unter Aufkochen in 100 ml PBS gelöst und auf 45° C abgekühlt. Zu 2 ml dieser Lösung wurden 0,1 ml einer 10- oder 20 % igen Suspension nativer Kaninchenblutkörperchen zugegeben und 0,1 ml Milzzellensuspension (s.o.). Die Mischung wurde sofort in Petrischalen mit 9 cm Durchmesser gegossen. Der noch flüssige Agar wurde durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt. Nach einer Inkubation von 1 - 3 Stunden bei 37° C wurden 1,5 ml 1:5 verdünntes Komplementserum vom Meerschweinchen auf der Oberfläche verteilt. Nach weiteren 15 min Inkubation bei 37° C entwickelten sich Plaques, welche insbesondere nach anschließender Aufbewahrung der Platten im Kühlschrank gut sichtbar waren und mit Hilfe eines Bakterienzählgerätes ohne Mühe ausgezählt werden konnten. Als optimal wurde eine Gesamtinkubationszeit von 2 Std und 15 min bei 37° C ermittelt. Zur Kontrolle dienten Platten mit Milzzellen nicht immunisierter Mäuse.
- b) Modifizierter Plaque-Test: Zum Nachweis von Milzzellen mit Antikörperbildung gegen RSA wurde ein modifizierter Plaque-Test benutzt, bei dem statt nativer Kaninchenerythrozyten RSA-sensibilisierte Schaferythrozyten Anwendung fanden. Auch hier erfolgte die Sensibilisierung der Schaferythrozyten mittels Carbodiimid.
- c) Serologischer Nachweis von Antikörpern in Plasmazellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz
- i. Herstellung der Präparate
- Für die Untersuchungen mit Hilfe der Immunfluoreszenz stellten wir aus den oben angegebenen Milzsuspensionen

auf entfetteten Objektträgern Tropfpräparate her. Mit einer Pasteurpipette wurde ein Tropfen der Suspension auf den vorbereiteten Objektträger gegeben, etwas verteilt und an der Luft trocknen gelassen. Es wurde auf eine genügende Verdünnung geachtet, damit die Zellen möglichst einzeln liegen, um genaue Differenzierungen zu ermöglichen (Balfour 1965, Klein 1970).

ii. Präparation des Anti-Maus-Immunglobulin-Konjugats

Zur Herstellung des Konjugats wurden 10 ml eines Anti-Maus-Gammaglobulins vom Schwein (Nordic SWAM/NC - 1068) 24 Stunden gegen einen Phosphatpuffer 0,01 M pH 7,0 dialysiert. Die IgG - Fraktion wurde über eine DEAE-Säule (Schleicher und Schüll) von 15 cm Länge und 2,4 cm Durchmesser durch Elution mit einem 0,025 M Phosphatpuffer pH 7,0 abgetrennt, gegen aqua dest. dialysiert und lyophilisiert.

Die Konjugation wurde im alkalischen Milieu durchgeführt. Die 2 ml IgG-Lösung (20 mg) wurden durch Zugabe von 2 ml eines Carbonat-Bicarbonatpuffers auf einen pH von 9,3 eingestellt. Langsam wurden 0,4 ml FITC-Lösung in Aceton (15 mg FITC auf 10 ml Aceton) im Eisbad zugetropft. Anschließend wurde 16 Stunden lang gerührt. Nicht gebundenes FITC wurde mittels Gelfiltration (Sephadex G-50) (Puffer: 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,5, Säule: Durchmesser 0,8 cm, Höhe 58,5 cm) entfernt. Das so erhaltene Konjugat wurde zur Fraktionierung nochmals über eine DEAE-Säule gegeben (Puffer: 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,5, Säule: Durchmesser 2,4 cm, Höhe 9 cm) und mit Salzlösungen steigenden Elektrolytgehaltes eluiert

- (1. Pufferwechsel: 9 Teile PO_4^{2-} + 1 Teil 0,5 M NaCl,
2. Pufferwechsel: 7 Teile PO_4^{2-} + 3 Teile 0,5 M NaCl,
3. Pufferwechsel: 5 Teile PO_4^{2-} + 5 Teile 0,5 M NaCl,
4. Pufferwechsel: 3 Teile PO_4^{2-} + 7 Teile 0,5 M NaCl).

Fraktion 2 und 3 ergaben die besten Resultate im Fluoreszenztest. Die so erhaltenen Fraktionen wurden auf optimale Konzentration eingeeengt und in kleinen Portionen zu 0,2 ml bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Eine ähnliche aber abgekürzte Methode verwenden Bergquist und Schilling (1970) und eine neue noch spezifischere Methode veröffentlichte vor kurzem Reisberg (1970) unter Verwendung von Carbodiimid.

iii. Durchführung des Immunfluoreszenz-Testes

Die Tropfpräparate wurden 3 Stunden unter dem Ventilator getrocknet. Auf jedes Präparat wurde ein Tropfen des Konjugats gegeben und 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Als feuchte Kammer wurde eine mit angefeuchtetem Filterpapier ausgelegte Plastikschaale verwendet. Nach Beendigung der Färbezeit wurden die Präparate 3 mal in isotoner Kochsalzlösung ausgewaschen, indem sie je zwei Minuten in eine mit der Kochsalzlösung gefüllte Glasschaale getaucht wurden und kurz darin geschwenkt wurden.

Die Objektgläser wurden rund um die mit Zellen bedeckten Stellen vorsichtig abgetrocknet und nach Zugabe eines Tropfens Glycerin: PBS 1:1 pH 7,0 mit einem Deckglas eingedeckt.

Die Präparate wurden kurz nach der Fertigstellung unter dem Mikroskop (Leitz Ortholux mit Auflichtfluoreszenzeinrichtung, Erregerfilter BG 3 + BG 38, Sperrfilter K 510, Objektiv Apo 1:40, Gesamtvergrößerung 1:500) beurteilt, spätestens bis zu 12 Stunden danach, da sich die Fluoreszenz im Laufe der Zeit unkontrollierbar ändert. Wurden die Bewertungen nicht sofort vorgenommen, so wurden die Präparate im Kühlschrank im Dunkeln aufbewahrt.

(Bewertung siehe Ergebnisse)

VII. Zellmorphologische Untersuchungen

1. Präparate mit Giemsa-Färbung

Für die Giemsa-Färbung sedimentierten wir die Zellen aus der Suspension durch Zentrifugieren, lösten das Sediment in einem Tropfen Rinderserumalbumin und machten davon Ausstriche, die luftgetrocknet wurden. Die Färbung erfolgte 2 Minuten in May - Grünwald, eine Minute in 1:2 verdünntem May - Grünwald, 15 Minuten in Giemsa (1 1/2 Tropfen / ml). Die Präparate wurden mit Giemsa-Wasser abgespült, getrocknet und eingedeckt (Morphologiekontrolle). Dann wurden sie auf den prozentualen Anteil der Lymphozyten an der Gesamtzellzahl untersucht.

2. Präparate mit Methylgrün - Pyronin - Färbung

Die Ausstriche für die Methylgrün - Pyronin - Färbung nach Perry und Reynolds (1956) wurden in der gleichen Weise zubereitet wie für die Giemsa-Färbung. Die luftgetrockneten Präparate wurden 10 Minuten in Carnoy fixiert, darauf einige Sekunden mit Äthanol behandelt, sodann mit aqua dest. gespült und sorgfältig getrocknet. Dann kamen die Präparate für 30 Minuten in Methylgrün - Pyronin - Lösung, wurden einige Sekunden in Butanol gespült, luftgetrocknet und eingedeckt. Die Präparate dienten außer zur morphologischen Kontrolle auch zur Erfassung von Zellen mit gesteigertem RNS - Gehalt. (Bewertung siehe Ergebnisse)

C ERGEBNISSE

I. Kopplung von Rinderserumalbumin an Erythrozytenmembranen

Die Kopplung wurde an nativen und formalinbehandelten Erythrozyten vom Kaninchen und vom Schaf sowohl mit der Tanninisierung als auch mit bisdiazotiertem Benzidin und mit Carbodiimid als Kopplungsreagenz durchgeführt. Die im passiven Hämagglutinationstest erhaltenen Titerwerte mit den verschiedenen Methoden zeigt Tabelle 1.

Die Kopplung mit bisdiazotiertem Benzidin erwies sich als die aufwendigste und wurde von uns nicht bis zu Ende durchgeführt.

Die Tanninmethode ergab Titer bis zu 2560, wurde dann aber hauptsächlich wegen der relativ rasch eintretenden Ablösung des Proteins von den Erythrozyten und der dadurch bedingten eventuellen Beeinträchtigung der Immunisierung nicht angewendet.

Als die am besten geeigneten Träger für das Rinderserumalbumin mit Hilfe der Kopplung mit Carbodiimid erwiesen sich native Kaninchenblutkörperchen (Johnson 1966).

Bei i.p. Injektion von 1 ml einer 5 % igen Suspension zeigten die Versuchstiere keine auffälligen Reaktionen.

Koppl. Reagens	Erythrozyten- konzentration	zur Kopplung ver- wendete Protein	reziproker Titer
Tannin	HBK 5 %	1,5 mg/ml	1250
Tannin	HBK 5 %	3 mg/ml	2560
Carbod.	HBK form. 5%	10 mg/ml	1280
Carbod.	HBK nat. 5%	10 mg/ml	2560
Carbod.	KBK nat. 5%	10 mg/ml	5120

Tabelle 1 In der passiven Hämagglutination erhaltene rezi-
proke Titerwerte bei Kopplung verschiedener Ery-
throzyten mit verschiedenen Methoden.

HBK = Hammelblutkörperchen

KBK = Kaninchenblutkörperchen

form. = formalinisiert

nat. = nativ

Carbod. = Carbodiimid

II. Absetzungsschema

Von den Mäusen wurde . jeden 2. bis 3. Tag, beginnend mit dem 5. Tag nach Immunisierung, ein Tier jeder Versuchsreihe abgesetzt (siehe Schema).

S c h e m a

Tag nach Primär- injektion	Tag nach Sekun- därinjektion	KBK imm.	KBK+RSA imm	
5	-	1	1	
7	-	1	1	
9	-	1	1	
12	-	1	1	
14	-	1	1	Sek.imm.
16	2	1	1	1
19	5	1	2	1
21	7	-	1	1
23	9	-	1	1
26	12	-	1	1
28	14	-	1	1
30	16	-	1	1
33	19	-	1	1

KBK imm. = mit Kaninchenblutkörperchen immunisierte Tiere

KBK + RSA imm. = mit Kaninchenblutkörperchen + gekoppeltem Rinderserumalbumin immunisierte Tiere

III. Serologischer Antikörpernachweis

1. Erythrozytenspezifische Antikörper mit lytischer Aktivität

Mit Hilfe der Hämolysintitration wurden in den durch Herzpunktion entnommenen Blutproben Antikörper mit hämolytischer Aktivität gegen membranständige Antigendeterminanten der Kaninchenblutkörperchen nachgewiesen.

a) Primärantwort nach einmaliger Injektion von Kaninchenblutkörperchen

In der Primärantwort gegen native Blutkörperchen konnte der höchste Titer mit $1/400$ bereits am 5. Tag nach Immunisierung nachgewiesen werden. An den darauffolgenden Tagen fielen die Titer sehr rasch ab, bereits am 12. Tag nach Immunisierung fanden sich keine nachweisbaren Hämolysine mehr.

(Tabelle 2)

b) Primärantwort nach einmaliger Injektion von Kaninchenblutkörperchen + RSA

Bei sämtlichen mit Kaninchenblutkörperchen und daran gekoppeltem Rinderserumalbumin immunisierten Tieren zeigten sich nach einmaliger Injektion der oben angegebenen Dosis kaum lytische Antikörper gegen Kaninchenblutkörperchen. Geringe Hämolysinmengen (Titer $1/25$) konnten nur bei einigen der Tiere nachgewiesen werden.

(Tabelle 2)

c) Sekundärantwort nach Zweitinjektion von Kaninchenblutkörperchen + RSA

Eine Zweitinjektion führten wir nur mit Kaninchenblutkörperchen + RSA durch. Dabei zeigten die Hämolysine bis zum 7. Tag nach Boosterinjektion eine steigende Tendenz bis zu $1/200$, um dann bis zum 16. Tag langsam abzufallen. Erst am 19. Tag nach der zweiten Injektion waren keine Hämolysine mehr nachweisbar.

(Tabelle 2)

Tage nach Immunisierung		Reziproker Endtiter nach Antigen		
prim.	sek.	KBK	KBK + RSA	
			prim.	sek.

0		0	-	-
5		400	25	
7		200	0	
9		50	25	
12		0	0	
14	Booster	0	0	
16	2	0	25	100
19	5	0	0	100
21	7			200
23	9			100
26	12			25
28	14			25
30	16			50
33	19			0

Tabelle 2

Reziproke Endtiter der hämolytischen Aktivität nach
Primär- und Sekundärstimulus

KBK = Kaninchenblutkörperchen

KBK + RSA = Kaninchenblutkörperchen mit gekoppeltem Rinder-
serumalbumin

prim. = Primärantwort

sek. = Sekundärantwort

2. Erythrozytenspezifische Antikörper mit agglutinierender Aktivität

Beim Nachweis von agglutinierenden Antikörpern ausschließlich gegen Antigendeterminanten der Kaninchenblutkörperchen wurden neben bivalenten Agglutininen zusätzlich auch monovalente Antikörper mittels der indirekten Technik unter Anwendung von Kaninchen - anti - Maus-Immunglobulinserum erfaßt.

a) Primärantwort nach einmaliger Injektion von Kaninchenblutkörperchen

Bei den mit nativen Kaninchenblutkörperchen immunisierten Tieren traten die höchsten Antikörpertiter am 5.Tag nach dem Stimulus auf mit einem Endtiter von $1/640$ im direkten Test und $1/1280$ im indirekten Test. Im direkten Test fielen dann die Titer sehr schnell ab, bereits am 12.Tag nach dem Stimulus lagen die Antikörpermengen unter der Nachweisgrenze, während im indirekten Test noch am 19.Tag nach Primärstimulus ein Titer von $1/160$ gefunden wurde.

(Tabelle 3)

b) Primärantwort nach einmaliger Injektion von Kaninchenblutkörperchen + RSA

Die mit Kaninchenblutkörperchen und gekoppeltem Rinder-serumalbumin immunisierten Tiere bildeten nur wenig bivalente Antikörper bis zu einer Verdünnungsstufe von $1/40$ am 5.Tag nach dem Stimulus, monovalente Antikörper dagegen bis zu einer Verdünnungsstufe von $1/640$ ebenfalls am 5.Tag, allerdings mit raschem Titerrückgang nach dem Stimulus. Im direkten Test waren am 12.Tag keine Antikörper mehr nachweisbar, im indirekten Test fanden sich auch am 19.Tag nach Immunisierung noch Antikörper.

(Tabelle 3)

c) Sekundärantwort nach Zweitinjektion von Kaninchenblutkörperchen + RSA

Nach dem Sekundärstimulus stiegen sowohl die mono- als auch die bivalenten Antikörpermengen steil an mit höchsten Werten bereits am 2.Tag nach Sekundärstimulus: $1/320$ im direkten und $1/640$ im indirekten Test, ohne jedoch die nach nativen Kaninchenblutkörperchen zu erwartenden Werte zu erreichen. Nachfolgend trat kein weiterer Anstieg mehr auf, im direkten Test fanden sich am 16.Tag im Serum keine nachweisbaren Antikörper mehr, im indirekten Test stiegen die Werte nach einem vorherigen gleichmäßigen Abfall am 14.Tag nach Sekundärstimulus nochmals bis auf $1/320$, um wieder abzusinken bis auf $1/80$ am 19.Tag nach dem Booster. (Tabelle 3)

3. Passive Hämagglutination (RSA-spezifische Antikörper)

Die passive Hämagglutination zum ausschließlichen Nachweis von Antikörpern gegen Rinderserumalbumin war in der Primärantwort negativ.

(Tabelle 4)

In der Sekundärantwort fand sich jedoch gleich am ersten Nachweistag, dem 2.Tag nach der zweiten Injektion, ein unerwartet hoher Titer von $1/320$, 3 Tage später nur ein Titer von $1/80$ und dann wieder eine steigende Tendenz bis zum 9.Tag nach Sekundärstimulus mit $1/320$. Ab dem 12.Tag blieb der Nachweis negativ.

(Tabelle 4)

Tage nach		Reziproker Endtiter nach Antigen					
Immunisierung		KBK		KBK + RSA			
prim.	sek.	dir. prim.	ind. prim.	dir. prim.	sek.	ind. prim.	sek.
0		-	-				
5		640	1280	40		640	
7		320	1280	20		160	
9		160	320	40		40	
12		0	640	0		40	
14	Booster	0	320	0		40	
16	2	0	320	0	320	40	640
19	5	0	160	0	160	40	320
21	7				160		160
23	9				40		80
26	12				40		80
28	14				160		320
30	16				0		160
33	19				0		80

Tabelle 3

Reziproke Endtiter der agglutinierenden Antikörper gegen Kaninchenblutkörperchen vom monovalenten und vom bivalenten Typ nach primärem und nach sekundärem Stimulus, nachgewiesen im direkten und im indirekten Test.

dir. = direkter Test

ind. = indirekter Test

Bedeutung der übrigen Abkürzungen siehe Tabelle 2

Tage nach Immunisierung		Reziproker Endtiter nach Antigen KBK+RSA	
prim.	sek.	prim.	sek.
5		-	
7		-	
9		-	
12		-	
14		-	
16	2	-	320
19	5	-	80
21	7		160
23	9		320
26	12		-
28	14		-
30	16		-
33	19		-

Tabelle 4

Nachweis der gegen Rinderserumalbumin gerichteten Antikörper mit Hilfe des passiven Hämagglutinationstests.

Bedeutung der Abkürzungen siehe Tabelle 2

IV. Zellulärer Antikörperrnachweis

1. Nachweis von antikörperbildenden Zellen mittels des Plaque-Tests

Nach anfänglichen Versuchen mit Mikrotropfen (Nossal 1958) ist es Jerne und Nordin (1963) und Ingraham (1964) möglich geworden, antikörperbildende Zellen quantitativ zu erfassen.

Die im erythrozytenhaltigen Agar am Ort fixierten Zellen können durch die Reaktion der von ihnen sezernierten lytischen Antikörper mit den umgebenden Erythrozyten in Form eines hämolytischen Hofes (Plaque) erkannt und gezählt werden. Auf der gleichen Basis ist von Pick (1967) eine Methode zur autoradiographischen Plaquezählung entwickelt worden.

Die Tatsache, daß bei Verwendung von heterologen Erythrozyten, mit denen nicht immunisiert wurde, keine Plaques auftreten, ist eine Spezifitätskontrolle.

Die Größe der Plaques, unserer Beobachtung nach variabel, wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Weil man mit der angewendeten Methode nur die sogenannten direkten Plaques nachweist, ist damit zu rechnen, daß nur Zellen, die Antikörper der IgM-Klasse produzieren, zur Auszählung kamen.

a) Primärantwort nach einmaliger Injektion von Kaninchenblutkörperchen

Nach einer einmaligen Injektion mit Kaninchenblutkörperchen war die Anzahl der hämolytischen Plaques bereits am 5.Tag nach der Immunisierung gegenüber der Kontrolle (nicht immunisierte Maus) erhöht, am 7.Tag hatte sich die Zahl vervierfacht und mit rund $270/10^6$ Zellen den höchsten Wert erreicht. An den folgenden Tagen trat eine sehr rasche Abnahme der Plaque-Zahl ein, ab dem 16.Tag lagen die Ergebnisse im Bereich der Kontrollwerte.

b) Primärantwort nach Immunisierung mit Kaninchenblutkörperchen + RSA

Wurden zur Immunisierung mit Rinderserumalbumin gekoppelte Kaninchenblutkörperchen verwendet, so trat eine Erhöhung der Plaquezahl mit rund 250 Plaques pro 10^6 Zellen bereits am 5.Tag nach Immunisierung auf, stieg bis zum 7.Tag noch weiter bis auf 410 Plaques/ 10^6 Zellen. Danach war der Gipfel überschritten, und die Werte kehrten bis zum 16.Tag nach Immunisierung auf die Werte der Kontrolle zurück.

(Tabelle 5)

c) Sekundärantwort nach Zweitimmunisierung mit Kaninchenblutkörperchen + RSA

Nach einer zweiten Injektion mit Kaninchenblutkörperchen mit gekoppeltem Rinderserumalbumin waren die Plaquezahlen bereits am zweiten Tag nach dem Sekundärstimulus über die Kontrolle erhöht, stiegen dann steil an bis zum 9.Tag nach dem zweiten Stimulus, erreichten Werte bis zu 600 Plaques / 10^6 Zellen, und fielen dann steil wieder ab. Werte im Bereich der Kontrolle waren aber auch am 19.Tag nach dem Sekundärstimulus noch nicht wieder erreicht.

2. Nachweis RSA-spezifischer Antikörper mit Hilfe des modifizierten Plaque-Test.

Die gegen Rinderserumalbumin gebildeten Antikörper wurden im modifizierten Plaque-Test unter Verwendung mit RSA beladener Schaferythrozyten festgestellt.

Ähnliches wurde bereits von anderen Autoren erfolgreich versucht (Landy 1965, Merchant 1966, Segre 1967, Walsh 1967, Daniels 1968, Golub 1968).

In der Primärantwort ging die Anzahl der gebildeten Plaques kaum über die Kontrollwerte hinaus, sodaß ein eindeutig positives Ergebnis nicht festgestellt werden konnte.

In der Sekundärantwort wurde lediglich am neunten Tag nach dem Stimulus mit $55/10^6$ Zellen ein signifikant erhöhter Wert gefunden.

Tag nach		Gebildete Plaques / 10 ⁶ Zellen nach					
Immunisierung		injiziertem Antigen					
prim.	sek.	KBK	KBK+RSA				
		Indikatorblutkörperchen					
		KBK	HBK+RSA	KBK	HBK+RSA		
				prim.	sek.	prim.	sek.
0		0	0				
5		61/71	0	236/252		1,7/0	
7		278/275	0	377/444		0/10	
9		52/77	0	62/45		6,8/16	
12		17/13	0	17/26		17/6,8	
14	Booster	18/9	0	8/5		16/8	
16	2	5/3	0	0/2	17/25	7/14	1,9/5,8
19	5	10/7	0	10/7	248/265	0/0	8/0
21	7				0 -		0-
23	9				474/692		53/55
26	12				61/45		2,2/0
28	14				42/32		6/4
30	16				37/31		4/0
33	19				30		0/0

Tabelle 5

Nachweis der Antikörperbildung an individuellen Zellen mit Hilfe des direkten (Indikator KBK) und des modifizierten (Indikator HBK + RSA) Plaque-Tests. Die Boosterung wurde am 14.Tag gegeben. Die Zahlen mit Querstrichen bedeuten jeweils Doppelbestimmungen.

Bedeutung der Abkürzungen siehe Tabelle 2

3. Fluoreszenzserologische Studien an individuellen Zellen.

Eine weitere Methode zur Erfassung immunologischer Phänomene auf zellulärer Ebene ist die Immunfluoreszenz. In dem hier verwendeten System stellten die von den Milzzellen gebildeten Immunglobuline die Antigene dar, welche mit fluoreszeinkonjugierten Anti - Maus Ig - Antikörpern reagieren und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht werden können.

Die Bewertung der Fluoreszenz an den Einzelzellen der Tropfpräparate erwies sich als sehr schwierig. Fast alle Zellen zeigten eine mehr oder minder ausgeprägte Grünfluoreszenz. Bei Lebendfärbung fanden Unanue (1971) und Rabellino (1971) bei 45 % der unstimulierten Milzzellen bereits eine Fluoreszenz, die sie auf Immunglobuline auf der Zelloberfläche zurückführen (Baur 1971). Diese Immunglobulin tragenden Zellen wurden als B-Lymphozyten angesehen. Um Fehldeutungen aus dem Wege zu gehen (Bruehhausen 1970) wurden nur die stark fluoreszierenden Zellen, die gegen den Hintergrund gut abgrenzbar waren, als die aktiv Antikörper synthetisierenden Zellen angesehen und das Augenmerk vor allem auf diese gerichtet. Über die Spezifität dieser Antikörper läßt sich in diesem Testsystem nichts aussagen. Im ganzen wurden die Zellen in drei Gruppen mit der Intensitätsbewertung +, ++, +++ eingeteilt. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse zusammengestellt.

a) Primärantwort nach einmaliger Immunisierung mit Kaninchenblutkörperchen

Bei der Betrachtung der prozentualen Anteile der stark fluoreszierenden Zellen⁽⁺⁺⁺⁾ in der Zeit nach der Injektion des Antigens zeigte sich, daß nach der Gabe von nativen Kaninchenblutkörperchen dieser Anteil am 5.Tag nach der

Immunisierung weit mehr beträgt als in der Kontrolle (nicht immunisiertes Tier), am 7.Tag noch höher stieg (von 6,4 auf 7,5 %) und an den folgenden Tagen bis auf 0 % sank.

Da der aus dem Rahmen fallende Befund am 19.Tag nicht von einem Anstieg der plaque-bildenden Zellen begleitet war, scheint es sich um einen unspezifischen Immunisierungseffekt zu handeln, wie er zum Beispiel nach einer Infektion auftreten kann.

- b) Primärantwort nach einmaliger Immunisierung mit Kaninchenblutkörperchen + RSA

Der Anteil der stark fluoreszierenden Zellen aus den Zellsuspensionen der mit Kaninchenblutkörperchen mit gekoppeltem Rinderserumalbumin immunisierten Tiere lag am 5.Tag nach Immunisierung bereits bei 7,5 % und am 7.Tag bei 14,7 % mit nachfolgendem Abfall auf 1 % am 19.Tag.

- c) Sekundärantwort nach Zweitimmunisierung mit Kaninchenblutkörperchen + RSA

Schon am zweiten Tag nach dem Sekundärstimulus mit gekoppelten Blutkörperchen hatte die Gruppe der hell leuchtenden Zellen 15 % der Gesamtzellzahl erreicht, am fünften Tag sogar 20 %. Nach einem deutlichen Rückgang zwischen dem 5. und 7.Tag änderten sich die Werte nur noch geringfügig mit einem kleinen Anstieg am 9.Tag nach Sekundärstimulus auf 8,4 %. Auch am 16. und letzten Nachweistag lagen die Ergebnisse mit 5,2 % noch weit über den Kontrollbefunden.

Tag nach Immunisierung		Injiziertes Antigen								
		KBK			KBK+RSA					
prim.	sek.	prim.			prim.			sek.		
		+++	++	+	+++	++	+			
0		0	15	65						
5		6,4	21	53	7,5	20	26			
7		7,5	46	45	14,7	47	21			
9		2,3	22	27	4,4	31	19			
12		2,8	84	0	3,0	46	54			
14	Booster	0	4	63	2,0	12	25	+++	++	+
16	2	0	33	51	2,0	29	67	15	25	34
19	5	7,1	29	45	1,0	56	41	20	5	41
21	7							7,3	56	30
23	9							8,4	45	25
26	12							6	72	15
28	14							5,9	34	26
30	16							5,2	68	14

Tabelle 6

Fluoreszenzserologische Untersuchungen an einzelnen Milzzellen der Maus mit Hilfe von fluoreszeinkonjugiertem Anti - Maus - Ig zur Darstellung der in den Milzzellen gebildeten Antikörper nach einem immunogenen Stimulus.

Bewertung der Zellen in % der Gesamtzahl von Zellen im Gesichtsfeld.

Übriges siehe Text.

Bedeutung der Abkürzungen siehe Tabelle 2

V. Zellmorphologie und RNS - Bestimmung

1. Giemsa-Färbung zur Differenzierung von lymphatischen Zellen

Nach der heute allgemein anerkannten Ansicht sind es vor allem Zellen des lymphatischen Systems (Fagreus 1948, Nossal 1962, Mellors 1963, Bussard 1965), die an der Antikörperbildung beteiligt sind. Mit Hilfe der Giemsa-Färbung konnten wir etwa 70 - 80 % der Milzzellen morphologisch eindeutig den verschiedenen Formen des lymphatischen Systems zuordnen. Die übrigen waren meist Granulozyten und Makrophagen.

2. Methylgrün - Pyronin - Färbung zur Charakterisierung der Zellen hinsichtlich ihrer RNS-Synthese

Mittels der Methylgrün - Pyronin - Färbung versuchten wir eine morphologische Charakterisierung der Zellen zugleich mit einer Beurteilung der Syntheseleistung an RNS während des Ablaufs der Immunantwort gegen KBK und KBK+RSA zu geben. Die RNS - Synthese kann durch die Zunahme der Pyroninophilie der Zellen beurteilt werden. Die Zellen wurden nach Morphologiekriterien und Pyroningehalt folgendermaßen klassifiziert:

kleine Lymphozyten	ohne Pyroninophilie
kleine Lymphozyten	mit Pyroninophilie
mittlere Lymphozyten	ohne Pyroninophilie
mittlere Lymphozyten	mit Pyroninophilie
große Lymphozyten	mit Pyroninophilie
große Lymphozyten	mit extrem starker Pyroninophilie

a) Primärantwort

In der Primärantwort zeigten sich in beiden Versuchsserien vergleichbare Ergebnisse: Die kleinen Lymphozyten mit Pyroninophilie haben eine sehr auffällige Kinetik. Es findet sich ein Gipfel am 9.Tag und nach einem geringen Abfall am 12.Tag ein weiterer steiler Anstieg, der ab dem 16.Tag in ein Plateau überzugehen scheint.

Der Anteil der mittleren Lymphozyten mit Pyroninophilie fällt nach einem Gipfel am 7.Tag von 40 % bzw. 55 % im folgenden, für die nativen bzw. mit RSA gekoppelten Kaninchenblutkörperchen stetig ab. (Abb. 9)

b) Sekundärantwort

Verfolgt man den weiteren Verlauf der Entwicklung nach Sekundärstimulus, so scheint es, daß die kleinen RNS-haltigen Zellen auf etwa gleichem Niveau bleiben, mit einem Minimum am 16.Tag nach dem Sekundärstimulus, dem aber wieder ein Anstieg folgt.

Die mittelgroßen pyroninophilen Zellen haben, langsam von 10 % ansteigend, einen Gipfel mit 27,5 % am 9.Tag nach dem Sekundärstimulus und bleiben dann auf einem Plateau von 20 %. Im Gegensatz zu dem hohen Gipfel in der Primärantwort erreicht der zweite nur mehr die halbe Höhe, zeigt jedoch keinen so starken Abfall mehr. (Abb.9)

VI. Vergleiche

1. Zusammenfassung der serologischen Methoden

- a) Lytische Antikörper nach Immunisierung mit Kaninchenblutkörperchen beziehungsweise Kaninchenblutkörperchen + RSA

Nach Immunisierung mit Kaninchenblutkörperchen traten in der Primärantwort Antikörper in 4fach höheren Titern auf als nach Immunisierung mit Kaninchenerythrozyten + RSA. Auch nach einem Booster mit Kaninchenerythrozyten + RSA lagen die Titer zwar über den nach einmaliger Injektion erzielten Werten aber unter den mit reinen Kaninchenerythrozyten erreichten Titern. Die sich über einen längeren Zeitraum erstreckende Reaktion deutete jedoch auf einen typischen Boostereffekt.

b) Agglutinierende Antikörper

Bei den agglutinierenden Antikörpern zeigten die bivalenten Antikörper einen kurzen, neun Tage dauernden Titeranstieg wieder mit viel höheren Werten in der Antwort gegen Kaninchenblutkörperchen als gegen Kaninchenblutkörperchen + RSA. Monovalente Antikörper ließen sich noch bis zum letzten Versuchstag nachweisen, auch hier mit entscheidend höheren Werten in der Antwort gegen Kaninchenblutkörperchen als gegen Kaninchenblutkörperchen + RSA.

c) Vergleich der Hämolysintitration und der Hämagglutination

Die Ergebnisse der Hämolysintitration und der Hämagglutination entsprechen sich weitgehend. In der Primärantwort findet sich eine recht gute Korrelation des Hämolysintests mit dem Titerverlauf des direkten Hämagglutinationstests. Bei beiden findet man die höchsten Titerwerte in der mit Kaninchenblutkörperchen immunisierten Serie am 5.Tag (nicht abgebildet, siehe Tabellen 2 und 3), mit nachfolgendem kontinuierlichem Abfall. Bei den mit Kaninchenblutkörperchen + RSA immunisierten Tieren zeigten sich in beiden Tests ondulierende Kurven, wenn auch die Hämagglu-

tion höhere Titer erreicht. Die Sekundärantworten weichen etwas voneinander ab. In der Hämagglutination findet sich das Maximum schon früher als in der Hämolyse-titration. Dennoch sind die Kurven durchaus vergleichbar. Auffallend ist vor allem der kleine, ganz spät auftretende Gipfel, der in beiden Tests zu finden ist und der in der Diskussion noch einmal zur Sprache kommt. So scheinen lysierende und agglutinierende Antikörper im gleichen Verhältnis im Verlauf der Immunantwort aufzutreten (siehe Abb.1). Doch hat offensichtlich die Koppelung von RSA an die Kaninchenblutkörperchen einen hemmenden Effekt auf die Freisetzung von Antikörpern beider Arten ins Blut.

d) Passive Hämagglutination

Wie vorher gezeigt, treten nach Injektion nativer Blutkörperchen vom Kaninchen in den beiden serologischen Tests höhere Titer auf, als wenn modifizierte Blutkörperchen verwendet werden. Die passive Hämagglutination ihrerseits zeigt, daß nach einmaliger Injektion von Kaninchenblutkörperchen + RSA keine gegen das gekoppelte Proteinantigen gerichteten Antikörper im Serum nachweisbar sind.

Nach einem zweiten Stimulus finden sich dann positive Ergebnisse. Doch ist der Ablauf der Antwort recht kurz, fast ähnlich einer Primärantwort. Es zeigt sich also, daß zwar nach Sekundärstimulus mit einer verstärkten Immunantwort gerechnet werden kann, daß jedoch die beiden Vollantigene gegenseitig die Höhe der Serumantikörper beeinflussen.

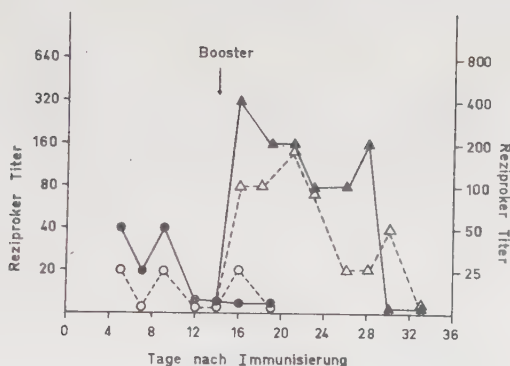


Abbildung 1. Vergleich der Hämolsintitration und der Hämagglutination für das Antigen Kaninchenblutkörperchen mit gekoppeltem Rinderserumalbumin.

O--O Hämolsintitration prim. Δ--Δ sek.

●—● Hämagglutination prim. ▲—▲ sek.

rechte Ordinate: reziproke Titer der Hämagglutination

linke Ordinate: reziproke Titer der Hämolsintitration

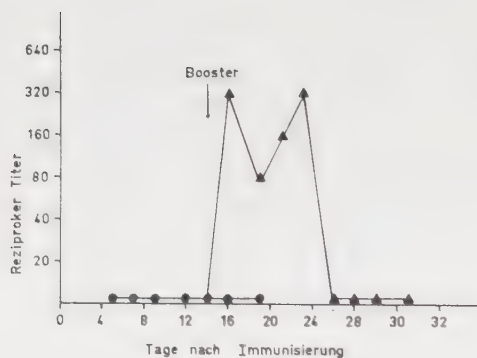


Abbildung 2. Passive Hämagglutination zum Nachweis von agglutinierenden Antikörpern gegen Rinderserumalbumin nach antigenem Stimulus mit Kaninchenblutkörperchen mit gekoppeltem Rinderserumalbumin.

● - ● Primärantwort
 ▲ - ▲ Sekundärantwort

2. Zusammenfassung der Ergebnisse zum Nachweis von Immunreaktionen auf zellulärer Ebene

Die zellulären Methoden geben Aufschluß über die Immunantwort der Milz.

a) Vergleichende Zusammenfassung der Werte des direkten und des modifizierten Plaque-Tests

Nach einmaliger Injektion von nativen Blutkörperchen entsteht im Plaque - Test eine geringere Anzahl von Plaques als nach einmaliger Injektion von gekoppelten Blutkörperchen. So ist am 5. Tag nach dem Stimulus die Zahl bei Gabe der modifizierten Blutkörperchen 3 - 4 mal so hoch wie bei den nativen Blutkörperchen. Am 7. Tag nach der Immunisierung steigt die Zahl bei den modifizierten Blutkörperchen noch bis auf das Doppelte der durch native Blutkörperchen erzeugten Zahl (Abb.3).

Im modifizierten Test finden wir dagegen fast keine Plaques in der Primärantwort gegen Rinderserumalbumin.

In der Sekundärantwort verstärkt sich die Antwort gegen die Blutkörperchen nochmals um etwa das Doppelte.

Auch im modifizierten Test finden sich nun einige Plaques gegen Rinderserumalbumin, jedoch nur als einmaliger Peak (Abb.4) am 9. Tag.

b) Zusammenfassung der Fluoreszenzserologischen Untersuchungen

Nach Immunisierung mit nativen Kaninchenblutkörperchen zeigt der Fluoreszenztest mit 7,5 % hell leuchtender Zellen nur halb so starke Antikörperbildung an als nach Immunisierung mit den modifizierten Blutkörperchen (14,7 %).

Nach einem zweiten Stimulus mit modifizierten Blutkörperchen steigt die Antikörperbildung nochmals um etwa ein Drittel bis auf 20 % hell leuchtender Zellen am 5.Tag nach dem Sekundärstimulus (Abb.5).

e) Vergleich der beiden zellulären Methoden

Die beiden letzteren Methoden, der Agar - Plaque - Test und der Immunfluoreszenztest stellen einen Versuch dar, Antikörper auf zellulärer Ebene zu erfassen.

Aus Abb.6 ergibt sich eine gute Übereinstimmung der Resultate beider Methoden, insbesondere in der Primärantwort. Bei der Sekundärantwort fällt der raschere Anstieg positiver Zellen im Immunfluoreszenztest auf.

Insgesamt sprechen die Befunde dafür, daß zumindest die stark fluoreszierenden Zellen tatsächlich als Produkte des Immunisierungsprozesses angesehen werden dürfen und der Nachweis in der Aussage dem der antigenspezifischen Erfassung antikörperbildender Zellen mittels des Plaque-testes weitgehend entspricht. Dabei bleibt allerdings darauf hinzuweisen, daß der Anteil positiver Zellen 0,06 % im Agar - Plaque - Test, im Fluoreszenztest dagegen 20 % beträgt.

3. Vergleich der zellulären und der serologischen Methoden

Die beiden serologischen Methoden zeigten eine gute Übereinstimmung in Bezug auf Anstieg und Abfall der Titerwerte. Ebenso stimmten die beiden zellulären Methoden recht gut überein.

Bei der Gegenüberstellung der serologischen und der zellulären Methoden (von denen in Abbildung 7 nur der Hämolyseintest und der Agar - Plaque - Test dargestellt sind) zeigt sich, daß sich zwar in der Primärantwort keine Korrelation findet, sehr wohl aber in der Sekundärantwort.

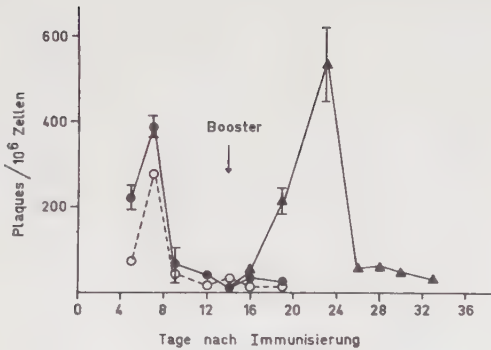


Abbildung 3. Agar - Plaque - Test zum Nachweis von Antikörper bildenden Zellen gegen Kaninchenblutkörperchen nach antigenem Stimulus mit Kaninchenblutkörperchen und Kaninchenblutkörperchen mit gekoppeltem Rinderserumalbumin.

Ordinate = Plaques / 10^6 Zellen

- Primärentwort KBK
- Primärentwort KBK + RSA
- ▲—▲ Sekundärentwort KBK + RSA

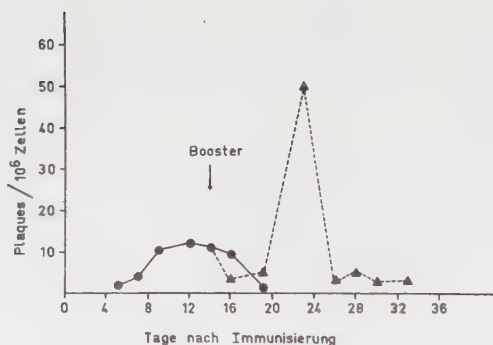


Abbildung 4. Modifizierter Plaques - Test zum Nachweis von Antikörper bildenden Zellen gegen Rinderserumalbumin nach Primär- und Sekundärstimulus mit Kaninchenblutkörperchen mit gekoppeltem Rinderserumalbumin.

● — ● Primärantwort
 ▲ --- ▲ Sekundärantwort

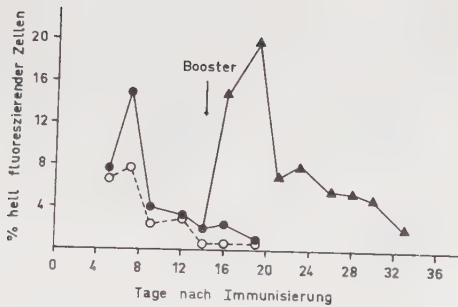


Abbildung 5. Immunfluoreszenztest. Verlauf des prozentuellen Anteils der hell fluoreszierenden Zellen (+++) nach Primär- und Sekundärstimulus.

- --- ○ Primärantwort KBK
- — ● Primärantwort YPM + RSA
- ▲ — ▲ Sekundärantwort KBK + RSA

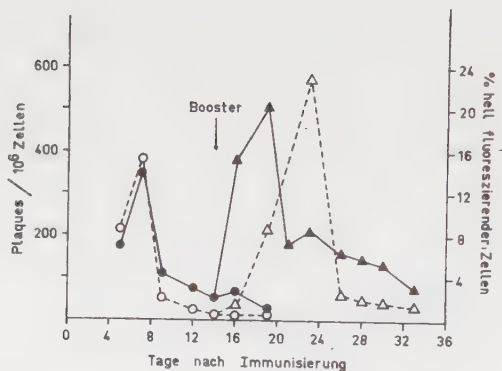


Abbildung 6. Vergleich der zellulären Methoden, d.h. der Immunfluoreszenz mit dem Agar - Plaque - Test für das Antigen KBK+RSA.

- Agar-Plaque-Test Primärantwort
- △--△ Agar-Plaque-Test Sekundärantwort
- Immunfluoreszenz Primärantwort
- ▲—▲ Immunfluoreszenz Sekundärantwort



Abbildung 7. Vergleich der Hämolysintitration mit dem Agar - Plaque - Test für das Antigen KBK + RSA

- - - ○ Agar - Plaque - Test Primärantwort
- △ - - △ Agar - Plaque - Test Sekundärantwort
- — ● Hämolysintest Primärantwort
- ▲ — ▲ Hämolysintest Sekundärantwort

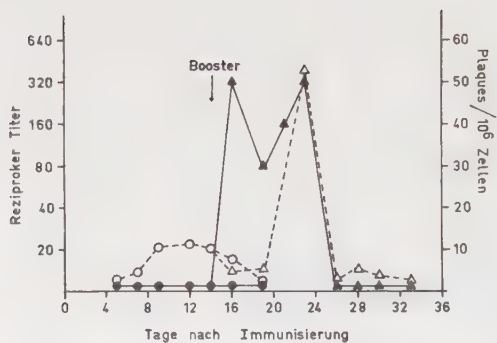


Abbildung 8. Vergleich der passiven Hämagglutination mit dem modifizierten Plaque - Test.

- — — ○ Agar - Plaque - Test Primärantwort
- △ — — △ Agar - Plaque - Test Sekundärantwort
- — — ● passive Hämagglutination Primärantwort
- ▲ — — ▲ passive Hämagglutination Sekundärantwort

Auffallend ist, daß bei Kaninchenblutkörperchen als Antigen die Anzahl der plaque-bildenden Zellen nur halb so groß wie bei Kaninchenblutkörperchen + RSA als Antigen ist, der Titerwert für Kaninchenblutkörperchen als Antigen jedoch um $4 \times \log 2$ größer ist als bei Kaninchenblutkörperchen + RSA als Antigen.

Die höchste Titerstufe wird, in der Hämolytintitration ebenso wie in der Hämagglutination, am 5.Tag nach Primärstimulus erreicht, der Plaque-Test hingegen weist die höchste Plaquezahl erst am 7.Tag auf.

In der Sekundärantwort, die nur mit Kaninchenblutkörperchen + RSA als Antigen durchgeführt wurde, findet sich die höchste Titerstufe am 7.Tag nach Sekundärstimulus, während im Plaque-Test der höchste Wert am 9.Tag auftritt. Dies steht nicht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren, die eine Kongruenz von Plaque-Test und hämolytischen Titern in einem System fanden, in dem Schafblutkörperchen als Antigen verwendet wurden (Wigzell 1966).

Beim Vergleich der passiven Hämagglutination und des modifizierten Plaque-Tests scheint der Plaque-Test etwas sensibler zu sein, denn in der Primärantwort finden sich bereits erhöhte Plaquezahlen gegenüber der Kontrolle während in der serologischen Methode nichts nachzuweisen ist.

In der Sekundärantwort findet sich in der passiven Hämagglutination eine Zweigipfligkeit, von diesen zwei Gipfeln stimmt der zweite mit dem modifizierten Plaque - Test überein. (Abb.8)

4. Zellmorphologie, RNS-Synthese und Antikörperbildung

Versucht man, die mittels der Methylgrün-Pyronin-Färbung gewonnen Ergebnisse (Abb. 9) mit den sich an den Zellen abspielenden Antikörperbildungsvorgängen zu vergleichen, so können am ehesten die mittelgroßen, pyroninophilen Zellen mit dem Verlauf der Immunantwort in Relation gebracht werden. Abbildung 10 zeigt einen Vergleich des Plaquetests mit dem Prozentanteil an der Gesamtzellzahl der mittelgroßen pyroninhaltigen Zellen.

Es zeigt sich dabei ein enger zeitlicher Zusammenhang zwischen der Anzahl der Plaque-bildenden Zellen und der Anzahl der pyroninhaltigen mittelgroßen Zellen. RNS, die mit Hilfe von Methylgrün - Pyronin färberisch erfaßt wird, wird sowohl vermehrt beim Einsetzen der Zellteilung gebildet als auch in den Vorstufen der Antikörperbildung, offenbar kann jedoch bereits während der Zellteilung die Antikörperbildung einsetzen.

Die kleinen pyroninophilen Zellen dagegen nehmen, erst nachdem die Immunantwort bereits abgelaufen ist, an Zahl zu und halten sich auch während der Sekundärantwort auf gleichem Niveau. Die mittelgroßen pyroninhaltigen Zellen zeigen auch in der Sekundärantwort nochmals einen Gipfen parallel zur Immunantwort, der jedoch im Gegensatz zur Primärantwort kleiner ist, obgleich die Antikörperbildung in der Sekundärantwort verstärkt ist.

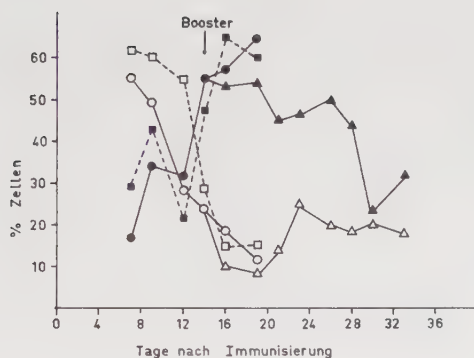


Abbildung 9. Methylgrün - Pyronin - Färbung.

mittl. Ly. mit = mittelgroße Lymphozyten mit
Pyroninfärbung

kl. Ly. mit = kleine Lymphozyten mit
Pyroninfärbung

□ — □ mittl. Ly. mit Primärantwort KBK

■ — ■ kl. Ly. mit Primärantwort KBK

○ — ○ mittl. Ly. mit Primärantwort KBK + RSA

△ — △ mittl. Ly. mit Sekundärantwort KBK +
RSA

● — ● kl. Ly. mit Primärantwort KBK + RSA

▲ — ▲ kl. Ly. mit Sekundärantwort KBK +
RSA

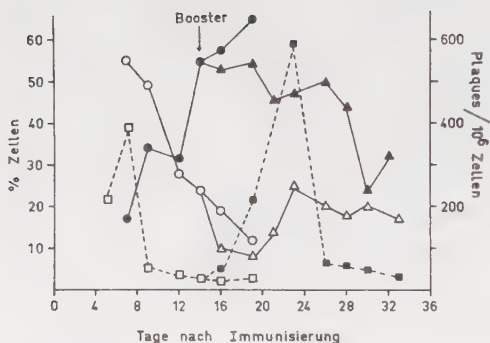


Abbildung 10. Vergleich der Methyl-Pyronin-Färbung mit dem Agar-Plaque-Test für das Antigen Kaninchenblutkörperchen mit gekoppeltem Rinderserumalbumin.

- -- □ Agar-Plaque-Test Primärantwort
- -- ■ Agar-Plaque-Test Sekundärantwort
- — ○ mittl. Ly mit Primärantwort
- △ — △ mittl. Ly mit Sekundärantwort
- — ● kl. Ly mit Primärantwort
- ▲ — ▲ kl. Ly mit Sekundärantwort

D. DISKUSSION

I. Methoden

In dieser Arbeit wurde versucht, den Ablauf der Immunantwort nach gleichzeitiger Gabe zweier gekoppelter Antigene zu beobachten, über den im Gegensatz zur Immunantwort auf ein einzelnes Antigen noch wenig bekannt ist, insbesondere bei unmittelbarer Verbindung dieser beiden Antigene. Dabei muß darauf hingewiesen werden, daß Zellen wie die Blutkörperchen freilich schon an sich Multiantigene sind, hier jedoch als Einheit betrachtet werden, da die Immunantwort gegen die Blutkörperchen nur insgesamt erfaßt werden kann, wohingegen die Immunantwort gegen RSA getrennt beobachtet werden kann.

Die beiden verwendeten Antigene wurden aneinander gekoppelt, wofür drei Methoden zur Wahl standen. Die Ansprüche, die an die Methode gestellt wurden, waren folgende:

1. geringe Veränderung der Membran, sodaß weder die Lysierbarkeit noch die Agglutinierbarkeit und damit die antigenen Eigenschaften entscheidend verändert wurden. Hier schied die Kopplung mit bisdiazotiertem Benzidin aus, da die Membran relativ stark angegriffen wird mit nachfolgender leicht einsetzender Lysis (Johnson 1966), was darauf schließen läßt, daß damit auch die antigenen Eigenschaften der Membran stark verändert werden.

2. Bindung von genügend Rinderserumalbumin an die Erythrozytenmembran, da anderenfalls die das Immunsystem erreichende Menge RSA für die Immunantwort zu gering ist. Da mit tanninisierten Erythrozyten sehr kleine Antikörpermengen nachweisbar sind, läßt sich schließen, daß viel Antigen an die Membran gebunden wird, doch sind die bindenden Assoziationskräfte nur schwach und das Protein neigt zur Dissozia-

tion von der tanninisierten Membran (Feinberg 1957, Johnson 1966).

Mit ECDI können dagegen verschiedene Substanzen aneinander oder an Erythrozytenmembranen in einer zur Immunisierung ausreichenden Menge gekoppelt werden (Talamo 1968, Davidson - Buchanan 1959, Goodfriend 1964), und, da es kovalent gebunden wird, ist damit zu rechnen, daß das RSA auch bei Erreichen des Immunsystems noch gebunden vorliegt. Dieser Methode wurde der Vorzug gegeben, weil sie die besten Voraussetzungen dafür schafft, daß sowohl gegen das gekoppelte Rinderserumalbumin als auch gegen den zellulären Träger, die Erythrozyten, eine Immunantwort in meßbarem Ausmaß erfolgt. Unberührt bleibt dabei die Frage, ob erythrozyten-eigene Determinanten ausgeschaltet oder neue weder erythrozytenspezifische noch RSAspezifische eingeführt werden (Davidson-Buchanan 1959, Stahmann 1959).

Die gebildeten Antikörpermengen wurden mit verschiedenen Methoden bestimmt, und die gewonnenen Ergebnisse versucht, in Relation zueinander zu bringen, sodaß eine vergleichende Beurteilung dieser Methoden hinsichtlich ihres Wertes bei der Erfassung der Immunantwort möglich wurde.

Um die unterschiedlichen, mit den verschiedenen Methoden gewonnenen Ergebnisse richtig würdigen zu können, muß zuerst bedacht werden, welche Vorbedingungen für die einzelnen Methoden gelten:

Was die serologischen Nachweismethoden anbetrifft, so erfassen sie die Antikörper nicht am Ort ihrer Entstehung, sondern die nachweisbare Menge wird durch mannigfache Faktoren beeinflusst:

Die Immunglobulinsynthese und die dazu benötigte Zeit, die Sezernierbarkeit und Diffusionsmöglichkeit der Antikörper aus der Zelle,

den Transport von der Bildungsstätte ins Blut, die Lebensdauer (Uhr 1963), die Affinität des Antikörpers zum Antigen (Mäkelä 1970), die Abbindung im Antigen-Antikörperkomplex (Almeida 1968), die Struktur (Pauling 1940) und die Heterogenität der Antikörper (v. Ghetie 1971).

Ein Hinweis auf die Menge der im Serum vorhandenen Antikörper ist die Verdünnung, bis zu der eine Hämolyse oder Agglutination noch nachweisbar ist. Erschwerend wirkt sich hier aus, daß es offensichtlich Konzentrationen gibt, oberhalb derer die Lyse oder Agglutination wieder schlechter wird, es also ein Konzentrationsoptimum gibt. Zudem ergibt die quantitative Messung von Antikörpern über Titerbestimmungen relative Werte, die eigentlich nur untereinander vergleichbar sind, nicht aber zwischen verschiedenen Testsystemen, da deren Nachweisempfindlichkeit unterschiedlich ist. Dies gilt sowohl für den Vergleich Agglutination - Lysis, als auch für die passive Agglutination. Ein Vergleich der verschiedenen Systeme ist somit nur hinsichtlich der Titerbewegung statthaft.

Daraus ergibt sich, daß mit den serologischen Methoden der Nachweis der Antikörper erst in einer Endstufe erfolgt, nämlich nach der vollständigen Synthese und nach ihrer Sekretion ins Blut, wobei eventuell auf dem Weg dorthin eine bestimmte Menge bereits im Antigen-Antikörperkomplex z.B. in Milz und Lymphknoten abgebunden wird, sodaß diese Antikörper nicht im Serum nachweisbar sind.

Mit Hilfe des Agar - Plaque - Testes und der Immunfluoreszenz werden die Antikörper um eine Stufe früher nachgewiesen:

im Agar - Plaque - Test unmittelbar nach der Abgabe durch die Zelle,
in der Immunfluoreszenz während der Synthese bzw. Abgabe in oder an der Zelle.

Daß die im Agar - Plaque - Test beobachteten Zellen tatsächlich die aktiven Antikörperproduzenten sind, kann als gesichert angesehen werden (Nossal 1958), zumal man sie auch in vitro zur Antikörperbildung stimulieren kann (Mishell 1966, 1967).

Beim Plaque-Test ist der Hämolysehof der Indikator für die antikörperbildende Zelle, wobei meist eine Plasmazelle oder ein mittelgroßer Lymphozyt im Mittelpunkt des Hofes gefunden wurde (Bussard 1965). Da die hämolytische Aktivität abhängig ist von der Zugabe von Komplement, hat es sich gezeigt, daß mit dem einfachen Plaque-Test nicht alle antikörper-bildenden Zellen erfaßt werden, nämlich nicht solche, deren Antikörper wenig oder kein Komplement binden können und die erst mit Hilfe spezifischer Antisera sichtbar gemacht werden können (Dresser 1965, Sterzl 1965, Möller 1967, Segre 1967, Golub 1968, Plotz 1968a,b). Da in unseren Untersuchungen nur der einfache oder sogenannte "direkte" Plaque-Test durchgeführt wurde, sind nur 193 Antikörper bildende Zellen nachgewiesen worden, während 75 Antikörper bildende Zellen unberücksichtigt blieben.

Spontane Plaques, wie sie in Systemen bei Verwendung von Schaferythrozyten auch bei nichtimmunisierten Tieren auftreten, kommen bei uns in den Kaninchenerythrozyten nicht vor.

Höhere Anzahlen an positiven Zellen findet man bei Verwendung von Gefrierschnitten (Steven 1967) oder über den Nachweis rosettenbildender Zellen (Gudat 1971).

Mit dem Plaque-Test können auch Substanzen nachgewiesen werden, die erst sekundär an die Erythrozytenmembran gekoppelt wurden (Merchant 1966, Daniels 1968), wie es auch in der vorliegenden Arbeit im indirekten oder modifizierten Plaque-Test zum Nachweis RSA-spezifischer Antikörper geschah. Wesentlich ist, daß im Plaque-Test die Bildung des gesuchten Antikörpers spezifisch nachgewiesen wird.

Die Immunfluoreszenz in dem hier verwendeten System weist die Immunglobuline unabhängig von ihrer immunologischen Aktivität nach, sodaß es sein kann, daß damit auch Immunglobuline unabhängig von ihrer Affinität zum gegebenen Antigen (KBK, KBK+RSA) erfaßt werden; sei es, daß es sich um einzelne Ketten, um Immunglobuline im Auf- oder Abbau handelt, daß die Antikörper schon im Antigen-Antikörperkomplex abgebunden sind oder gegen ganz andere Antigene gerichtet sind, oder daß es sich um unspezifische Immunglobuline handelt.

Dabei ist zu bemerken, daß in der Milzzellpopulation stets (auch bei nicht immunisierten Tieren) mehr oder minder fluoreszierende Zellen nachweisbar waren, was teils auf unspezifische Fluoreszenz, teils auf Stimulierung von Immunglobulinproduktion durch andere unspezifische Reize zurückzuführen ist.

In dieser Arbeit wurde deshalb die Untersuchung auf die Auszählung stark fluoreszierender Zellen beschränkt. Dies ist insofern etwas problematisch, da, falls B-Lymphozyten Antikörper-Muster auf der Oberfläche tragen, die schwache Fluoreszenz eventuell die Anzahl immunkompetenter Zellen

angibt, die damit nicht erfaßt wird. Es scheint jedoch, daß zum Beweis der Antikörpersynthese nach Immunisierung nur die starke Fluoreszenz in Frage kommt.

Die Immunfluoreszenz ist geeignet zum Nachweis von Immunglobulinen in und an der Zelle. Die Möglichkeit, die das fluoreszenztechnische Verfahren bietet, die nachzuweisende Substanz anhand ihrer Fluoreszenzintensität zu identifizieren wurde in der vorliegenden Arbeit halbquantitativ genutzt.

Vorschläge zur quantitativen Bestimmung wurden von Rigler (1965) und Killander (1970) gemacht und an anderer Stelle ausgeführt (Pachmann et al., Manuskript im Druck).

II. Immunantwort gegen ein Antigen

In der Immunantwort nach einer einmaligen Gabe von Kaninchenblutkörperchen fand sich sowohl im Hämagglutinationstest als auch in der Hämolyseintitration bereits am 5. Tag eine fallende Tendenz in den Serumtitern. Der Beginn des Titeranstiegs wurde somit hier nicht erfaßt. Er ist bereits am 3.- 4. Tage nachweisbar (Vigzell 1966).

Im Agar-Plaques-Test und in der Immunfluoreszenz war die höchste Anzahl an Zellen am 7. Tag an der Immunantwort beteiligt. Zur Erklärung dieser Inkongruenz waren folgende Möglichkeiten denkbar:

Es können im Ablauf der Immunantwort bis zum 7. Tag noch weiterhin mehr Zellen zum Aufbau von Globulinen aktiviert werden, pro Zelle jedoch weniger Antikörper produziert werden.

Es kann, während noch der Stimulus zur vermehrten Ausbildung der plaque-bildenden Zellen wirksam ist, bereits zu einer Verminderung der Globuline kommen, sowohl über die

Bildung von Antigen - Antikörperkomplexen, als auch durch allgemeine Abbaumechanismen (Möller 1968).

Möglich erscheint auch, daß ein Teil der von den Milzzellen gebildeten Antikörper nicht in das Serum übertreten, weil sie in der Milz an dort noch vorhandenem Antigen gebunden werden und so unseren serologischen Nachweisverfahren nicht zugänglich sind. Eine weitere Möglichkeit ist, daß es sich am 7.Tag bereits vermehrt um Antikörper der IgG-Klasse handelt, die eine geringere lytische und agglutinierende Aktivität pro Molekül haben als die Antikörper die an den vorhergehenden Tagen auftreten. Es ist bekannt, daß die 19 S Antikörper, die am Anfang der Immunantwort auftreten, eine sehr hohe lytische Aktivität haben, das heißt, etwa drei Moleküle können einen Erythrozyten lysieren (Humphrey 1965), wogegen die im weiteren Verlauf der Immunantwort auftretenden 7 S Antikörper etwa tausendfach so hoch konzentriert sein müssen, um den gleichen Effekt zu zeigen.

Weiterhin zeigte Mäkelä (1970), daß sich die immunologische Affinität im Laufe der Immunantwort ändert, das heißt, daß es zu verschiedenen Zeitpunkten der Immunantwort Antikörper mit unterschiedlicher Bindungsfähigkeit an das Antigen gibt.

Auch sind die angewendeten Tests vielleicht nicht empfindlich genug, denn Rapp (1966) konnte zum Beispiel mit dem Transfertest und dem Komplementfixationstest etwa die dreifache Antikörpermenge nachweisen als mit dem Hämolysestest.

Am ehesten scheint die Deutung richtig, daß am 7.Tag zwar weiterhin ein erhöhter Anteil der zur Immunantwort fähigen Zellen aktiviert ist, die Effektivität der produzierten und ins Serum abgegebenen Antikörper aber bereits geringer ist.

III. Immunantwort gegen zwei Antigene

Die Antikörperbildung gegen zwei Antigene kann mit der gegen ein einziges Antigen in der Primärantwort verglichen werden.

Es muß darauf hingewiesen werden, daß die zur Immunisierung gegebene RSA-Menge sicher viel geringer war als bei reiner RSA-Immunisierung (suboptimal), ohne daß genaue quantitative Angaben gemacht werden können. Trotzdem zeigte es sich, daß sie anscheinend ausreichend war, um die Antikörperbildung gegen Kaninchenerythrozyten wesentlich und eindeutig zu beeinflussen.

Dabei zeigt sich, daß die Titer der serologischen Tests nach Gabe zweier Antigene niedriger liegen als nach Gabe eines Antigens. Die zellulären Tests zeigen dagegen nach Gabe zweier Antigene eine stark erhöhte Anzahl positiver Zellen im Vergleich zu einem Antigen. Ähnliche Resultate wie die hier gezeigten, nämlich daß trotz vermehrter Einbeziehung von Zellen in die Immunantwort die Serumtiter nicht steigen, sondern sogar fallen, wenn zwei Antigene gleichzeitig gegeben werden, erhielten auch Rowley und Fitch (1968). Sie gaben die antigene Substanz in Kombination mit einem Adjuvans und verglichen die Ergebnisse mit denen nach Gabe der antigenen Substanz alleine. Dabei erhöhten sich die Anzahlen Plaque-bildender Zellen nach Adjuvans sehr stark, während die Serumantikörper keineswegs adäquat stiegen.

IV. Gegenseitige Beeinflussung der beiden Antigene

Eine Erklärung für diese Inkongruenz zwischen Serumantikörpern und antikörperbildenden Zellen könnte mit der gegenseitigen Einflußnahme der Antigene auf die jeweilige Immunantwort gegeben werden. Demnach käme dem an die Kainchenerythrozyten gekoppelten Rinderserumalbumin in der Primärantwort in Bezug auf die Immunantwort gegen die Blutkörperchen eine Art Adjuvantienwirkung zu, jedoch nur bezogen auf die Anzahl antikörperbildender Zellen in der Milz, nicht was die Serumantikörper anbetrifft. Dies, ohne daß gegen das Rinderserumalbumin selbst Antikörper gebildet wurden. Oder zumindest traten die Antikörper in so geringen Mengen auf, daß sie sich den hier angewendeten Methoden zum Nachweis entzogen.

Man könnte annehmen, daß durch zwei Antigene zwei Arten immunkompetenter Zellen angesprochen werden, sodaß die Immunantwort zweigleisig läuft. Andererseits scheint die Effektivität der einzelnen Immunantwort, gemessen am Immunprodukt im Serum, geringer.

Die in der Sekundärantwort nachgewiesenen Antikörper gegen Rinderserumalbumin zeigen in der passiven Hämagglutination zwei aufeinanderfolgende Gipfel, von denen nur einer am 9. Tag nach Sekundärstimulus mit dem Gipfel im modifizierten Plaque-Test zusammenfällt. Einen ähnlichen doppelgipfligen Kurvenverlauf findet man in weniger auffälliger Form auch im Hämagglutinations- und Hämolyse-Test.

Zu denken wäre eventuell an die Einwirkung des an die Erythrozyten gebundenen Rinderserumalbumins, etwa in der Weise, daß das an die Membran konjugierte Protein die antigenen Stellen schützt und damit verhindert, daß sich Antigen-Antikörperkomplexe bilden können. Die überschüssigen Antikörper könnten deswegen, solange dieser Schutz

wirkt, im Serum nachgewiesen werden. Ebenso könnte umgekehrt das Rinderserumalbumin unangreifbar werden für die spezifischen Antikörper dadurch, daß es in Vertiefungen der Erythrozytenmembran sitzt. Dieser Schutz könnte unwirksam werden, sobald das Rinderserumalbumin von der Membran abgelöst würde. Der nun folgende Serumtiterabfall würde bedeuten, daß die antigenen Stellen für die Antikörper zugänglich geworden sind, der neuerliche Titeranstieg, daß die weiterhin steigende Antikörperproduktion den Abfall wieder ausgleicht.

Auf eine weitere Schutzfunktion der Antigene füreinander deutet auch die Tatsache hin, daß nach Gabe der gekoppelten Antigene eine verstärkte zelluläre Immunantwort auftritt verglichen mit der Immunantwort nach Gabe nur eines Antigens. Vermutlich beruht hier der Mechanismus darauf, daß das Antigen nicht so rasch vom Antikörper abgeben werden kann, länger im Organismus zirkuliert und damit stärker stimulierend wirkt. Eine ähnliche Funktion wird auch den üblicherweise gebräuchlichen Adjuvantien zugeschrieben.

Dies bedeutet also, daß nach Gabe zweier eng gekoppelter Antigene diese sich nicht gegenseitig verdrängen, etwa durch kompetitive Bewerbung um vorhandene antikörperbildende Zellen, sondern daß sie im Gegenteil die Immunantwort verstärken und damit eine Art Adjuvanswirkung haben (Dresser 1969).

V. RNS - Synthese während der Immunantwort in Lymphozyten

Mit der Methylgrün - Pyronin - Färbung wurde der Versuch gemacht, die RNS-Synthese während der Immunantwort in den Lymphozyten zu untersuchen.

Eine auffällige Charakteristik zeigte die Zellpopulation der mittelgroßen pyroninhaltigen Zellen. Der prozentuale Anteil dieser Zellen an der Gesamtpopulation stieg und fiel parallel zu der Antikörperbildung, sowohl nach einmaliger Gabe von Kaninchenblutkörperchen als auch nach Gabe von mit Rinderserumalbumin gekoppelten Kaninchenblutkörperchen.

In der Sekundärantwort hatte die Anzahl dieser Zellen ebenfalls noch einen Gipfel gleichzeitig mit der vermehrten Antikörperbildung, der jedoch nicht mehr die gleiche Höhe erreichte wie in der Primärantwort, obgleich der Plaque-Test und der Immunfluoreszenztest eine vermehrte Einbeziehung von Zellen in die Immunantwort zeigten. Dies macht es wahrscheinlich, daß diese Zellen eng an die Primärantwort gebunden sind.

Die mittelgroßen pyroninophilen Zellen können Zwischenstufen der Zellteilung sein, aus welcher letztlich die antikörperbildenden Zellen hervorgehen, aber auch die Memoryzellen.

Diesen Zellen spricht man die Fähigkeit zu, nach einem Sekundärstimulus mit einer verstärkten und rascher einsetzenden Immunantwort zu reagieren (Nossal 1962, 1965).

Im Anschluß an die Primärantwort treten nämlich andere Zellen stark in den Vordergrund, die Population der kleinen pyroninophilen Zellen, deren Anzahl im Anschluß an den Gipfel der Antikörperbildung sehr hoch ansteigt. Ihre Anzahl bleibt während der ganzen Sekundärantwort gleichmäßig erhöht, und ihr Anteil macht um 50 % der Gesamtpopulation aus. Erst im Anschluß an den Abfall der Antikörperbildung fällt ihre Anzahl langsam ab.

Die starke Vermehrung dieser Zellpopulation im Anschluß an die Immunantwort auf einen Primärstimulus, der gleich-

mäßig große Anteil an der Gesamtpopulation während der Sekundärantwort geben zu der Deutung Anlaß, daß es sich bei den kleinen pyroninophilen Lymphozyten um die sogenannten Memorzellen handeln könnte.

Die Erscheinung der verstärkt und schneller einsetzenden Sekundärantwort mit der Postulierung der Memoryzellen, die unmittelbar mit dem zugeführten Antigen reagieren und sofort zu antikörperbildenden werden, führte zur Schlußfolgerung, daß einmal zur Antikörperbildung aktiviertes genetisches Material auch für längere Zeit nach dem Stimulus in bestimmten Zellen noch schnell verfügbar ist (Post 1970). Die Clonal - Selection Theorie, aufgestellt von Burnett (1959) und erweitert (Nossal 1958, 1960), versucht dieses Phänomen so zu erklären, daß präformierte Zellen auf einen antigenen Reiz mit Teilung, Differenzierung und Antikörperbildung reagieren, und daß entweder diese Zellen dann in ein ruhendes Stadium übergehen, aus dem sie wieder aktiviert werden, oder daß aus Zellteilungen Zellen hervorgehen, die die Information weitertragen, ohne selbst an der Immunantwort auf den Primärstimulus teilgenommen zu haben, den Weg zur antikörperbildenden Zelle jedoch bereits zurückgelegt haben und bei einem Sekundärstimulus sofort in spezifische antikörperbildende Zellen übergehen. Mittelgroße, pyroninhaltige Zellen entstehen wie in der Primärantwort so auch in der Sekundärantwort im Verlauf der Teilung weiterer neu sensibilisierter Zellen (zweiter kleiner Gipfel während der Sekundärantwort).

VI. Anzahl der an der Immunantwort beteiligten Zellen

Die in der Sekundärantwort antigenspezifische Antikörper produzierenden Zellen stellten auf der Höhe der Immunantwort 1 ‰ der Gesamtpopulation dar, wie aus dem Plaque-

Test entnommen werden konnte. Dagegen konnten in der Immunfluoreszenz 20 % positive Immunglobulin produzierende Zellen gezählt werden. Die pyroninophilen, das heißt an der RNS-Synthese beteiligten Zellen machten sogar einen Anteil von über 50 % aus, wobei ein großer Teil der Pyronin-positiven Zellen zu den Vorstufen der antikörperbildenden Zellen gehört. Harris (1970) fand, daß an der DNS-Synthese beteiligte Zellen auf der Höhe der Immunantwort ebenfalls 50 % der Gesamtpopulation an Milzlymphozyten ausmachen.

Da der Mechanismus der Proteinsynthese auch für die Immunglobuline gilt, heißt das, daß die Zell-DNS ihre Information auf die messenger-RNS überträgt und an dieser an den Ribosomen mit Hilfe der transfer-RNS das Protein synthetisiert wird (Jakob, Monod 1961).

Wenn es tatsächlich so ist, daß in der Immunantwort auf der Ebene der DNS- und RNS-Synthese ein großer Anteil der Milzzellen reagiert, wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt, eventuell unter Aufnahme des Antigens (Coons 1951, Fishman 1961, Unanue 1969), so scheint davon nur ungefähr die Hälfte zur Immunglobulin-Synthese überzugehen, und ein sehr kleiner Teil spezifische Antikörper zu produzieren.

Freilich produziert auch ein nicht experimentell stimuliertes Immunsystem regelmäßig Antikörper verschiedener Reaktionsspezifität, entsprechend sind dauernd Vorstufen vorhanden (spontane Transformation). Eine Antwort auf einen experimentellen Stimulus läßt sich davon nur dadurch trennen, daß eine entsprechend zeitgerechte über dieses Niveau erhöhte Transformationsrate nach dem Stimulus auftritt.

Schlußbemerkungen

Über die in dieser Arbeit gewonnenen Resultate hinaus scheinen auch die Ergebnisse der letzten Jahre darauf hinzudeuten (Mikhailowa 1971), daß bei der Antwort auf einen antigenen Stimulus ein weitaus größerer Prozentsatz an Lymphozyten beteiligt sein kann, als bisher angenommen wurde.

Eine Vorstellungsmöglichkeit wäre zum Beispiel, daß durch das Antigen, ebenso wie durch unspezifische Stimulantien, Mitogene wie Phytohämagglutinin und ähnliche (Transplant.Review 1972), der gesamte Immunapparat in "Habacht"stellung gebracht wird, das heißt es kommt zur Zellteilung und RNS-Synthese, Viele Zellen werden zur Immunglobulinproduktion angeregt, von denen dann ein kleiner Teil spezifische Antikörper, die gegen das Antigen gerichtet sind, synthetisiert.

Analogien gibt es zu dieser Hypothese in vielen Bereichen der Biologie, die zeigen, daß viel mehr Zellen bereitgestellt werden, als tatsächlich in Funktion treten.

Zusammenfassung

Ziel der Untersuchungen dieser Arbeit war die vergleichende Beurteilung der Immunantwort der Maus einerseits nach Immunisierung mit Kaninchenblutkörperchen andererseits mit Kaninchenblutkörperchen, an deren Oberfläche RSA mit Hilfe von Carbodiiimid gekoppelt worden war.

In diesem Zusammenhang wurden verschiedene immunologische Verfahren zur Erfassung der Immunantwort geprüft und miteinander verglichen.

Als wesentliche Ergebnisse sind zu nennen:

1.) In der Primärantwort wurde die Serum-Antikörperbildung gegen erythrozyteneigene Antigene durch die Kopplung von RSA an die Erythrozytenoberfläche reduziert, obwohl keine RSA-spezifische Antikörperbildung nachgewiesen werden konnte.

2.) In der Sekundärantwort war die Bildung gegen erythrozyteneigene Antigene gerichteter Serum-Antikörper stärker ausgeprägt als in der Primärantwort, jedoch war die Primärantwort nach Immunisierung mit Kaninchenerythrozyten (nativ) deutlich besser als die Sekundärantwort nach Immunisierung mit gekoppelten Kaninchenerythrozyten.

3.) Die Bestimmung von Lysinen und Agglutininen gegen Kaninchenerythrozyten zeigte zeitlich bezüglich des Titerverlaufs übereinstimmende Ergebnisse. Im Agglutinations-Coombs-Test konnten sowohl in der Primärantwort als auch in der Sekundärantwort eine verlängerte Antikörperbildung im Vergleich zum direkten Test nachgewiesen werden.

Im passiven Hämagglutinationstest zur Erfassung von RSA-spezifischen Antikörpern konnten solche nur kurzfristig und in geringen Mengen in der Sekundärantwort nachgewiesen werden.

- 4.) Im Plaque-Test und im Immunfluoreszenztest konnte eine höhere Zahl immunologisch aktiver Zellen nach Immunisierung mit RSA-gekoppelten Kaninchenerythrozyten als nach Immunisierung mit nativen Kaninchenerythrozyten nachgewiesen werden.
- 5.) Im Immunfluoreszenztest konnte die prozentuale Zunahme stark fluoreszierender Zellen zeitlich der Immunantwort zugeordnet werden.
- 6.) Die Erfassung der Immunantwort mit verschiedenen Methoden zeigte in ihrem zeitlichen Ablauf keine wesentlichen Unterschiede, woraus geschlossen werden kann, daß mit den Verschiedenen Methoden zeitlich eng zusammenhängende immunologische Phänomene beobachtet wurden.

Literaturverzeichnis

- ATTARDI G., Cohn M., Horribata K.
Lennox E.S. On the Analysis of Antibody
Synthesis at the Cellular
Level.
Bacteriological Reviews 23
(1959) S. 213
- ATTARDI G., Cohn M., Horribata K.
Lennox E.S. Antibody Formation by Rabbit
Lymph Node Cells.
J. Immunology 93 (1964)
S. 94
- BALFOUR B.M., Cooper E.H.,
Alpen E.L. Morphological and Kinetic
Studies on Antibody-Pro-
ducing Cells in Rat Lymph
Nodes.
Immunology 8 (1965) S.230
- BAUR S., Vitetta F.S., Sherr C.,
Schenkein I., Uhr J.W. Isolation of Heavy and Chains
of Immunoglobulins from the
Surfaces of Lymphoid Cells.
J.Immunology 106 (1971)
S. 1133
- BEEHENBAUM Autodiographic Lokalisation
of Antibody*
Immunology 2 (1959) S. 71
- BERGQUIST N.R., Schilling W.G. Preparation of Anti-human
Immunglobulin for Indirect
Tracing of Auto-anti-bodies.
aus: "Standardization in
Immunofluoreszenz"
1970

BOYDEN S.V.

The Adsorption of Proteins
on Erythrocytes Treated with
Tannic Acid, Subsequent
Hemagglutination by Antiprot-
ein Sera.

J. Exp. Med. 93 (1951)
S. 107

BOYDEN S.V.

The Adsorption of Antigen by
Spleen Cells previously
treated with Antiserum in
Vitro.

Immunology 3 (1960) S. 272

BORDUAS A.G., GRABAR P.

Passive Hemagglutination

Ann. Inst. Pasteur 84 (1953)
S. 903

BRUCHHAUSEN D., Hofermann R.,
v. Mayersbach H.

Studies on Nuclear Staining
by the Fluorescent Antibody
Method. Nonimmunological
Factors Leading to Nuclear
Fluorescence.

Immunology 19 (1970) S. 1

BUCHANAN-DAVIDSON D.J.,
Dellert E., Kornguth S.
Stahmann M.A.

Quantitative Studies on the
Modified Proteins

J. Immunology 83 (1959)
S. 543

BUSSARD A.E., Binet J.L.

Electron Micrographie of
Antibody-Producing Cells.
Nature 205 (1965) S. 675

- CHILLER J.M., Habicht G.S.
Weigle W.O.
Cellular Sites of Immunologic
Unresponsiveness.
Proc.Nat.Acad.Sci. 65 (1970)
S. 551
- COONS A.H., Leduc E.H.
Kaplan M.
Localization of Antigen in
Tissue Cultures.
J.Exp. Med. 93 (1951) S. 173
- DANIELS J.C., Weigle W.O.
Antibody Producing Cells in
Rabbits injected with
Soluble BSA.
Hemolytic Plaque Assay.
J.Immunology 101 (1968)
S. 1223
- DRESSER D.W., Vortis H.H.
Use of Antiglobulin Serum to
detect Cells Producing Anti-
body with Low Hemolytic
Efficiency.
Nature 208 (1965) S. 895
- EMBO International Training
Course on Cell Mediated
Interactions Stockholm 1970
- FEINBERG R.J., Flick J.A.
Elution of Tollen Antigens
from Tannic Acid Treated
Erythrocytes.
Proc.Soc.Exp.Biol. 96 (1957)
S. 71
- FISHMAN
Antibody Formation in Vitro.
J. Exp. Med. 144 (1961)
S. 837

HIRAMOTO N.R., Hamlin N.M.
Harris H.L.

The Detection of Antibody-
Containing Cells in the Blood
Stream during the IgM Cellular
Antibody Response.
J. Immunology 100 (1968)
S. 637

HUMPHREY J.M.
Dourmashkin R.R.

In "Complement"
herausgeg. von G.E.W. Wolsten-
holme
Ciba Foundation Symp.
Churchill LTD, London (1965)
S. 175

INGRAHAM J.S., Bussard A.

Application of a Localized
Hemolytic Reaction for Detec-
tion of Individual Antibody-
Forming Cells.
J. Exp.Med. 119 (1964) S. 667

JACOB F., Monod J.

Genetic Regulatory Mechanism
in the Synthesis of Proteins.
J.Mol Biol. 3 (1961) S. 318

JEHN W.W., Karlin L.

Independent Action of Thymus
and Bone Marrow Cells during
the Secondary Response of
direct Plaque-Forming Cells.
J. Immunology 106 (1971)
S. 946

JERNE N.K., Nordin A.A.

Floque Formation in Agar by
Single Cells.
Science 140 (1963) S. 105

JERNE N.K.

A New Theory
in "Immune surveillance"
R.T. Smith and M. Leachy editors
Academic Press Inc. N.Y.
(1970)

JOHNSON H.M., Brenner K.

The Use of Water-Soluble Carbodiimide as a Coupling Reagent
in the Passive Hemagglutination
Test.

J. Immunology 97 (1966) S. 791

KHORANA H.G.

The Chemistry of Carbodiimides.
Chem. Rev. 53 (1953) S. 145

KILLANDER D., Levin A.,
Inoue M., Klein E.

Quantification of Immunofluorescence on Individual Erythrocytes Coated with Varying
Amounts of Antigen.

Immunology 19 (1970) S. 151

KLEIN E.

Demonstration of the Reactivity of a Tissue Culture Cell
Line Daudi with Anti-Daudi-
Immunoglobulin Reagents.

- LANDY M., Sanderson R.P.,
Jackson A.L. Humoral and Cellular Aspects
of the Immune Response to the
Somatic Antigen of
S. Enteritidis.
J.Exp.Med. 122 (1965) S.483
- LAPRESLE C., Webb T. Isolation and Study of a
Fragment of Human Serum Albu-
min, Containing one of the
Antigenic Sites of the Whole
Molecule.
Bioch. J. 95 (1965) S. 245
- LAY W.H., Mendes N.F. Bianco C., Binding of SRBC to a Large
Nussenzweig V. Population of Human Lymphocytes
Nature 230 (1972) S. 531
- MÄKELÄ O., Nossal G.V. Antibody-Production by Single
Cells.
J. Immunology 87 (1961)
S. 447
- MÄKELÄ O., Ruoslahti E., Affinity of IgM and IgG
Seppälä I.J.T. Antibodies.
Immunochemistry 7 (1970)
S. 917
- MERCHANT B. Hrabec T. Lymphoid Cells Producing
Antibody against Simple
Haptens. Detection and
Enumeration.
Science 153 (1966) S. 1378

MIKHAILOVA A.A., Petrov R.W.
Zakharoval A.

Immunoglobulin Synthesis in
Mixed Cultures of Syngeneic
Cells of Different Lymphoid
Tissues
J. Immunology 106 (1971)
S. 1086

MISHELL R.J., Dutton R.W.

Immunization of Normal Mouse
Spleen Cell Suspensions in
Vitro.
Science 153 (1966) S. 1004

MISHELL R.J., Dutton R.W.

Immunization of Dissociated
Cell Cultures from Normal
Mice.
J.Exp.Med. 126 (1967) S. 423

MÖLLER E., Britton S.
Möller G.

Homeostatic Mechanisms in
Cellular Antibody Synthesis
and Cell Mediated Immune
Reactions.
in "Regulation of Antibody
Response" B. Cinader ed.

MÖLLER G.

Demonstration of Mouse Iso-
antigens at the Cellular
Level by the Fluorescent
Antibody Technique.
J.Exp.Med. 114 (1961) S. 415

MÖLLER G. ed.

Transplant.Review 1972, 11

Möller G., Wigzell H.

Antibody Synthesis at the
Cellular Level. Antibody-
Induced Suppression of 19S
and 7S Antibody-Response.
in "Regulation of Antibody
Response" B. Cinader ed.
in press

ROSSAL G.W.

Antibody Production by Single
Cells.
Brit.J.Exp.Path. 39 (1958)
S. 144

- NOSSAL G.V., Lederberg J. Antibody Production by Single Cells.
Nature 181 (1958) S. 1419
- NOSSAL G.V. Studies on the Transfer of Antibody-Producing Cells.
Immunology 3 (1960) S. 109
- NOSSAL G.V., Mäkelä O. Autoradiographic Studies on the Immune Response.
J.Exp.Med. 115 (1962) S. 209
- NOSSAL G.V., Austin C.M., Ada G.L. Antigens in Immunity
Immunology 9 (1965) S. 333
- PACHMANN K., Killander D., Wigzell H. Increase in Intracellular Immunoglobulins in the Majority of Splenic Lymphoid Cells after Primary Immunization.
Europ.J. Immunology in press
- PAULING L. A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies.
J.Am.Soc.Chem. 62 (1940) S. 2643
- PERRY S., Reynolds J. Methyl-Green-Pyronin as a Differential Nucleic Acid Stain for Blood Smears.
Blood 11 (1956) S. 1132
- PLAYFAIR J.H.L., Papermaster B.W., Cole L.J. Focal Antibody Production by Transferred Spleen Cells.
Science 149 (1965) S. 990
- RICK E., Föllmann J.D. Autoradiographic Fleques for the Detection of Antibody-Formation to Soluble Proteins by Single Cells.
Science 156 (1967) S. 964

PLOTZ P.H., Colten H.
Talal N.

Mouse Macroglobulin Antibody to
Sheep Erythrocytes. A non Com-
plement-Fixing Type.
J.Immunology 100 (1968) S. 752

PLOTZ P.H., Talal N.
Asofsky R.

Assignment of Direct and
Facilitated Hemolytic Plaques
in Mice to Specific Immunoglo-
bulin Classes.
J. Immunology 100 (1968) S. 744

PORTER R.R.

The Isolation and Properties of
a Fragment of Bovine Serum Albu-
min which retains the Ability
to Combine with Rabbit Anti-
serum.
Bioch.J. 66 (1967) S. 677

POST J., Hoffmann J.

Replication of Spleen Lympho-
cytes in the Young Rat in Vivo.
Exp.Cell Research 60 (1970)
S. 103

PRESSMANN D., Campbell D.H.

The Agglutination of Intact Azo-
Erythrocytes by Antisera Homo-
logous to the Attached Groups.
J. Immunology 44 (1942) S. 101

RABELLINO E., Colon S.,
Grey H.M.

Immunoglobulins on the Surface
of Lymphocytes.
J.Exp.Med. 133 (1971) S. 156

- RAPP H.J., Borsos T.
Forssman Antigen and Antibody.
Preparation of Water Soluble
Antigen and Measurement of Anti-
body Concentration by Precipitin
Analysis, by C1a Fixation and
by Hemolytic Activity.
J.Immunology 96 (1966) S. 913
- REISBERG U.A., Rossen R.D.
Butler W.T.
A Method for Preparing Specific
Fluorescein-Conjugated Antibody
Reagents, Using Bentonite Immuno-
adsorbents.
J.Immunology 105 (1970) S. 1151
- RIGLER R.jr.,
Die Fluoreszenzmikrospectropho-
tometrie und ihre Anwendungs-
möglichkeiten bei der Immunhisto-
logie.
Acta Histochemica Suppl.VII
S. 351
- ROWLEY D.A., Fitch F.W.
The Rate of Division of Anti-
body-Forming Cells during the
Early Primary Immune Response.
J.Exp.Med. 127 (1968) S. 983
- SCHUBERT D.
Carbohydrate Attachment to
Immunoglobulin Subunits.
J.Mol.Biol. 51 (1970) S. 287
- SCHUBERT D., Cohn M.
Immunoglobulin Biosynthesis III
Blocks in Defective Synthesis .
J.Mol.Biol. 38 (1968) S. 273

- SEGRE M., Segre D. Hemolytic Plaque Formation by Mouse Spleen Cells Producing Antibodies against Rabbit Immunglobulin G.
J.Immunology 99 (1967) S. 867
- SHAPIRO S., Scharff H. Synthesis of Excess Light Chains of Gamma Globulin by Rabbit Lymph Node Cells.
Maizel U., Uhr J.W. Nature 211 (1966) S.243
- SHEEHAN A New Method of Forming Peptide Bonds.
J.Am.Chem.Soc. 77 (1955) S. 1067
- STAHMANN M.A., Lapresla C., Immunochemistry of Synthetic Polypeptides an Polypeptidyl Proteins.
Buchanan-Davidson D.J., J.Immunology 83 (1959) S. 534
Grabar P.
- STERZL J., Riha J. A Localized Hemolysis in Gel Method for the Detection of Cells Producing 7S Antibody.
Nature 208 (1965) S. 858
- STEVEN E. Observations of the Hemolytic Antibody Response by a Localized Hemolysis in Gel over Frozen Sections of Mouse Spleen.
Proc.Soc.Exp.Med.Biol. 126 (1967) S. 84
- STIMPFELING The USE of PVP as a Developing Agent in Mouse Hemagglutination Tests.
Transpl. Bull. 27 (1962) S. 109

- TALAMO R.C., Haber E.,
Austen K. Antibody to Bradykinin.
J.Immunology 101 (1968) S. 333
- TANNENBERG W.J.K.,
Malaviya A. The Life Cycle of Antibody-
Forming Cells.
J.Exp.Med. 128 (1968) S. 895
- UHR J.W., Finkelstein M.S. Antibody Formation.
J.Exp.Med. 117 (1963) S. 457
- UNANUE E.R., Cerottini J.C., Beford M. Persistence of Antigen on the
Surface of Macrophages.
Nature 222 (1969) S. 1193
- UNANUE E.R., Grey H.H., Rabellino E. Immunoglobulins on the Surface
of Lymphocytes.
J.Exp.Med. 133 (1971) S. 1189
- WALSH P., Maurer P., Egan M. Detection of Immune Response
against Synthetic Polymers of
Amino Acids employing the Plaque-
Forming Cell System.
J.Immunology 98 (1967) S. 344
- WIGZELL H., Möller G. Studies at the Cellular Level of
the 19S Immune Response.
Acta.path.microbiol.scand. 66
(1966) S. 530
- WIGZELL H. Specific Fractionation of Immun-
competent Cells.
Transpl.Rev. 5 (1970) S. 76
- WORTIS H.H., Taylor R.B., Dresser D.W. Antibody Production studied by
Means of the Localized Hemolysis
in Gel (LHG) Assay.
Immunology 14 (1968) S. 69

Ich möchte Herrn Oberarzt Privatdozent Dr. Schierz, auf dessen Anregung hin die vorliegende Arbeit entstanden ist, meinen herzlichen Dank sagen für die freundliche Anleitung und seine aufmerksame, ständige Unterstützung. Die angenehme Atmosphäre in seinem Labor und die zuvorkommende Hilfsbereitschaft von Fräulein von Busch und Frau Obermüller haben mir die Durchführung der Arbeit erleichtert. Für die Reinschrift danke ich Frau Kany.

L e b e n s l a u f

Ich, Katharina Pachmann, geb.Hümmer wurde am 1.November 1947 als Tochter des Studienrates Eugen Hümmer und seiner Ehefrau Jutta geb.Seyler in Neuendettelsau Kreis Ansbach geboren. Ich besuchte die Volksschule in Ansbach und Lindau(B) und von 1957 bis 1966 das Neusprachliche Gymnasium in Lindau(B), das ich mit der Reifeprüfung 1966 abschloß. Von 1966 bis 1973 studierte ich an der Ludwig Maximilians-Universität in München an der Medizinischen Fakultät. Dort legte ich am 19.Februar 1973 die ärztliche Prüfung ab. Seitdem betreibe ich am Institut für Zellforschung des Karolinska Institutes Stockholm Studien in Quantitativer Immunfluoreszenz.

